

Mestrado Profissional
Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais

Isa Rebecca Chagas da Costa

**PROTEÔMICA DE SOLOS DE QUATRO FITOFISIONOMIAS ASSOCIADAS À
CANGAS FERRUGINOSAS DA SERRA DOS CARAJÁS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais, área de Ciências Ambientais, do Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITV).

Orientador: Rafael Borges da S. Valadares, Dr.

Belém/PA

2019

Título: Proteômica de solos de quatro fitofisionomias associadas à cangas ferruginosas da Serra dos Carajás.	
Classificação: () Confidencial () Restrita () Uso Interno (x) Pública	Revisão 01

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C837 Costa, Isa Rebecca Chagas da
 Proteômica de solos de quatro fitofisionomias associadas à cangas ferruginosas da Serra dos Carajás. / Isa Rebecca Chagas da Costa -- Belém-PA, 2018.
 70 f.: il.

Dissertação (mestrado) -- Instituto Tecnológico Vale, 2019.
 Orientador: Rafael Borges da Silva Valadares, Dr.

1. Ciência do solo – Química orgânica. 2. Solo - Microrganismos. 3. Fitofisionomia. I. Título.

CDD 23 ed. 631.417

Bibliotecário (a) responsável: Nisa Gonçalves - CRB2: 525

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades concedidas, aos meus guardiões por todo amparo, por estarem sempre ao meu lado, me guiando e abençoando, por emanarem muito amor e luz, grata por caminharem comigo nessa estrada da vida.

Aos meus pais, por todo amor, dedicação e apoio em toda minha jornada, por me proporcionarem condições de estar aqui, por me socorrerem nos momentos de necessidades, grata por tudo, sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao professor, Rafael Valadares, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Obrigada por acreditar em mim e pelos elogios e incentivos. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio. Grata pela paciência, amizade, conversas e pelos ensinamentos. Você foi e é muito mais que um orientador, gratidão.

Ao Instituto Tecnológico Vale por toda a estrutura disponibilizada, por fornecer equipamentos de última geração, viabilizando o desenvolvimento de toda a pesquisa; e também por proporcionar um colegiado com professores altamente qualificados, contribuindo com nosso crescimento profissional.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida, o que viabilizou minha vinda e estadia para esta cidade e assim exercer o curso de mestrado e a Vale S.A pelo financiamento e apoio à pesquisa.

Aos colegas de laboratório Sidney Nascimento por ter ensinado toda a metodologia de extração de proteínas, Felipe Trindade e Paulo Henrique por me acompanharem e ajudarem nas extrações, Manoel Lopes técnico responsável do laboratório, grata por todo o suporte concedido sempre com muita boa vontade. E ao Renato Oliveira e Talvane Lima por todo ensinamento e ajuda com a bioinformática.

Aos amigos Elis, Potira, Tayná, Wérica, Kléber, Steve e Eliézer por tornarem minha estadia nessa cidade uma experiência maravilhosa, grata por me acolherem, por fazerem parte de minha vida e me incluírem na de vocês.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste.

RESUMO

Na Serra dos Carajás coexistem diferentes tipos de riquezas, além de grandes jazidas minerais há uma alta biodiversidade associada a ecossistemas únicos, dentre eles, os campos rupestres ferruginosos (canga). Os ecossistemas que compõem as áreas de canga possuem características peculiares e clima severo, impondo um ambiente dinâmico para os organismos. Presente em topos de montanhas estes ambientes sofrem com intensas radiações UV, ventos fortes, variações térmicas diárias, solos rasos, ácidos, pobres nutricionalmente e com baixa retenção de água, além de possuírem significativas concentrações de metais pesados. Os microrganismos edáficos exercem papel fundamental para o equilíbrio desses ambientes, são responsáveis por processos relacionados à manutenção e funcionalidade dos solos, como os ciclos biogeoquímicos e interações ecológicas, incluindo as que beneficiam as plantas que habitam a canga. A detecção de proteínas permite enxergar quais processos microbianos estão ativos e interpretar quais rotas metabólicas podem ser mais importantes para a manutenção de cada ecossistema. Devido à heterogeneidade dos ambientes que compõem as áreas de canga, acredita-se que existam distinções taxonômicas e funcionais nos perfis moleculares do solo de cada fitofisionomia que compõem o mosaico de paisagens de Carajás. Através de uma abordagem metaproteômica, almejou-se a obtenção de informações funcionais e filogenéticas de quatro fitofisionomias das áreas de canga ferruginosa da Serra de Carajás: Campo Rupestre Arbustivo, Campo Rupestre de *Vellozia*, Campo Graminoso e Capão Florestal. Foram analisadas 32 amostras de solos de canga por cromatografia líquida e espectrometria de massas e obteve-se um total de 3760 proteínas, sendo possível a anotação de 1328 proteínas (obtenção da função, localização celular e processos moleculares associados a cada proteína). O metaproteoma indicou uma grande quantidade de proteínas e organismos exclusivos de cada fitofisionomia. Todavia, estas proteínas parecem estar envolvidas, em grande parte, nas mesmas rotas metabólicas, demonstrando um alto grau de redundância funcional nas comunidades microbianas que habitam os solos das cangas de Carajás. O predomínio de vias de sinalização intracelular e de proteínas de membrana indica intensa interação entre organismos e ambiente, com provável objetivo de desenvolver estratégias para sobreviver sob as condições extremas as quais estão submetidos. Enzimas chaves vinculadas a ciclagem de nutrientes como C, N, P, e S também foram detectadas neste estudo. Também observou-se alta similaridade do ponto de vista molecular entre as fitofisionomias dos Campos Rupestres Arbustivo e de *Vellozia*. Por fim, embora ainda existam limitações nas técnicas disponíveis para a metaproteômica de solos, foi possível obter o proteoma da maioria das amostras analisadas. Foi possível também derivar informações bioquímicas importantes a respeito de cada fitofisionomia, demonstrando, sobretudo o potencial da metaproteômica como ferramenta para estudo da diversidade funcional dos solos e monitoramento ambiental de áreas nativas ou impactadas.

Palavras-Chave: Canga; Fitofisionomias; Microrganismos do solo; Metaproteômica.

ABSTRACT

In the Serra dos Carajás coexist different types of riches, in addition to great mineral deposits there is a high biodiversity, constituting unique ecosystems, among them, the ironstone outcrops (canga). The ecosystems that compose the canga areas have peculiar characteristics and severe climate, imposing a dynamic environment for organisms. Present in mountain tops these environments suffer from intense UV radiations, strong winds, daily thermal variations, shallow, acidic, poor nutritionally soils and with low water retention, besides having significant concentrations of heavy metals. The edaphic microorganisms play a fundamental role in the equilibrium of these ecosystems. They are responsible for processes related to soil maintenance and functionality, such as biogeochemical cycles and ecological interactions, including those that benefit plants that inhabit canga. Protein detection allows us to discover which microbial processes are active and to interpret which metabolic pathways may be most important for the maintenance of each ecosystem. Due to the heterogeneity of the environments that compose the canga areas, it is believed that there are taxonomic and functional distinctions in the molecular soil profiles of each phytophysiognomy that compounds the mosaic of Carajás landscapes. Through a metaproteomic approach, we aim to obtain functional and phylogenetic information from four phytophysiognomies of the ferruginous canga areas of Serra de Carajás: Campo Rupestre Arbustivo, Campo Rupestre de *Vellozia*, Campo Graminoso and Capão Florestal. Thirty-two samples of canga soils were analyzed by liquid chromatography and mass spectrometry, a total of 3760 proteins were identified. It was possible to annotate 1328 proteins (obtaining the function, cellular location and molecular processes associated with each protein). The metaproteom indicated a large amount of proteins and organisms unique to each phytophysiognomy. However, these proteins appear to be involved, in large part, in the same metabolic pathways, demonstrating a high degree of functional redundancy in the microbial communities that inhabit the soils of Carajás cangas. The predominance of intracellular signalling pathways and membrane proteins indicates intense interaction between organisms and environment, probably aiming to develop strategies to survive under the extreme conditions they are subjected to. Key enzymes linked to nutrient cycling such as C, N, P, and S were also detected in this study. High molecular similarity was also observed between the phytophysiognomies of Campos Rupestres Arbustivo and *Vellozia*. Finally, although there are still limitations in the techniques available for soil metaproteomics, it was possible to obtain the proteome of most samples analyzed. Thereby, to derive important biochemical information regarding each phytophysiognomy, demonstrating, above all, the potential of metaproteomics as a tool for the study of soil functional diversity and environmental monitoring of native or impacted areas.

Key-Words: Ironstone outcrops. Metaproteomics. Soil microorganisms. Phytophysiognomies.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1	A Província Mineral de Carajás.....	13
3.2	Canga e suas fitofisnomias	14
3.3	Importância da microbiota para manutenção dos ecossistemas	16
3.4	Metaproteômica	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Local de Amostragem.....	19
4.2	Amostras de Solo.....	19
4.3	Extração de proteínas do solo	20
4.4	Digestão das proteínas	21
4.5	Dessalinização das amostras.....	22
4.6	Cromatografia Líquida Bidimensional acoplada a Espectrometria de Massa	22
4.7	Bioinformática	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Quantificação e distribuição de proteínas.....	24
5.2	Categorização Funcional	27
5.3	Enzimas presentes nos solos de canga.....	29
5.4	Agrupamento de proteínas em rotas metabólicas	31
5.5	Two-component system: Via de sinalização bacteriana.....	33
5.6	ABC transporter e Quorum Sensing	44
5.7	Metabolismo dos Nutrientes	46
5.8	Similaridades entre os Campos Rupestres de Arbustivo e de <i>Vellozia</i>	55
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

A extração mineral é uma das atividades mais antigas exercida pelo homem, primeiramente como forma de sobrevivência, e, posteriormente, assumindo a posição de fonte produtora de bens sociais e industriais, sendo fundamental na evolução alcançada pela humanidade. Os minerais estão presentes nos meios de comunicação, meios de transporte, equipamentos medicinais, utensílios domésticos e demais instrumentos para diversas finalidades em nosso dia-a-dia. Entretanto, as atividades mineradoras desencadeiam impactos ambientais que devem ser remediados e/ou mitigados conforme a legislação vigente.

O estado do Pará possui a segunda maior província mineral do mundo, englobando importantes depósitos de Fe, Au, Cu, Mn e outros metais (GALARZA; MACAMBIRA, 2002), destacando-se as jazidas de minério de ferro, as quais estão entre as de maior teor do mundo (LINDENMAYER; LAUX; TEIXEIRA, 2001). Todavia, Carajás abriga outros tipos de riqueza, uma vez que estando inserida na Floresta Amazônica, possui uma elevada biodiversidade com altos índices de endemismo, compondo uma variedade de ecossistemas únicos que devem ser preservados (GIULIETTI; PIRANI, 1988; MMA, 2004; CORRÊA, 2011).

Os ecossistemas presentes em afloramentos ferruginosos conhecidos como canga, são peculiares e estão entre os menos conhecidos e mais ameaçados do Brasil, devido a sua distribuição restrita e associada aos principais depósitos de minério de ferro do país (JACOBI; CARMO, 2008). As camadas superficiais de canga são originárias de formações ferríferas, e exercem controle na distribuição da cobertura vegetal (SCHAEFER et al., 2015). Os solos de canga podem ser classificados como superficiais e deficientes em estrutura e em nutrientes, pouco férteis, ácidos, com baixa retenção de água e com presença de metais pesados (SILVA, 1992; MATIAS et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2016).

Nas montanhas ferruginosas da Serra dos Carajás coexistem diferentes padrões ambientais, que vão desde as típicas ilhas florestais a formações vegetais mais abertas, formando um mosaico que constitui o complexo rupestre da região. Para este trabalho foram adotadas classificações fitofisionômicas descritivas, considerando as quatro de maior predominância nas áreas de canga, e tendo como base a classificação feita por Schaefer et al., (2016). São elas: Campo Rupestre de *Vellozia* (CRV); Campo Rupestre Arbustivo (CRA); Campo Graminoso (CG) e Capão Florestal (CF). É importante ressaltar que a diversidade

vegetal nestas áreas é um dos fatores que determina a disponibilidade e a composição de substâncias orgânicas liberadas no solo, interferindo desse modo, na composição das comunidades microbianas (Odham et al., 1986).

No solo, ocorrem inúmeros processos com alto grau de complexidade, alguns resultantes da atividade dos microrganismos presentes nesse ambiente, e suas inter-relações e funções para a sanidade vegetal, qualidade do solo e do meio ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os solos de áreas onde ocorre extração mineral sofrem alterações devido ao desmatamento, remoção da camada superficial e intenso revolvimento, impactando negativamente a composição da microbiota presente e os processos edáficos (MELLONI, 2007).

Os microrganismos presentes no solo influenciam os aspectos físicos e químicos deste complexo e dinâmico ambiente (DICK; SCHUMACHER, 2015). Além de realizarem associações simbióticas, imprescindíveis para o crescimento e desenvolvimento da vegetação (VASCONCELOS et al., 2016). Desempenham também importante papel na decomposição de compostos orgânicos, na transformação dos materiais do solo, e principalmente na ciclagem de nutrientes (BASTIDA et al., 2009). Muitas dessas reações são favorecidas por enzimas microbianas, proteínas individuais que, em grande escala, podem ser consideradas como as essenciais para a homeostase do planeta (WILMES; BOND, 2006).

Com a evolução da biologia molecular o estudo da microbiota se tornou mais fácil, e o interesse por conhecer melhor este universo tem crescido cada vez mais. A metagenômica é a caracterização em larga escala do material genético procedente de uma fonte biológica ou ambiental (GOTELLI; ELLISON; BALLIF, 2012), uma ferramenta utilizada para identificar genes que podem estar envolvidos em processos celulares e bioquímicos do solo (BASTIDA et al., 2009). Por sua vez, a detecção de proteínas permite enxergar quais processos microbianos estão ativos e interpretar quais rotas metabólicas são mais importantes para a manutenção de um determinado ecossistema. A metaproteômica, portanto é a caracterização em larga escala de todo o componente protéico da microbiota de um ambiente em um determinado momento (WILMES; HEINTZ-BUSCHART; BOND, 2015).

As abordagens meta-ômicas, especialmente a metaproteômica, permitem o exame simultâneo de várias funções proteicas ajudando, portanto, a desvendar a interação entre a dinâmica da respiração do solo, estrutura da comunidade microbiana e funcionamento

fisiológico dos microrganismos do solo em um determinado ambiente (BASTIDA et al., 2009; AYLWARD et al., 2012; BASTIDA; JEHLICH, 2016a).

Os microrganismos são essenciais na ciclagem e liberação dos nutrientes e na manutenção da composição química do solo, água, sedimentos e atmosfera, além de serem parte fundamental no desenvolvimento de qualquer organismo. Conhecê-los é importante para entender o funcionamento dos ecossistemas envolvidos. As paisagens que compõem a Serra dos Carajás são constituídas de características muito específicas e pouco conhecidas, e estas tornam o ambiente de difícil estabilidade para os organismos. Estas mesmas áreas são ainda pouco estudadas, mas, bastante exploradas devido suas riquezas minerais, resultando em áreas impactadas. Conforme legislação vigente a restauração ecológica de áreas impactadas é necessária, para tanto é imprescindível um conhecimento a fundo da composição e funcionamento de tal ambiente.

Tendo consciência de toda influência que a microbiota presente no solo exerce para o equilíbrio ecossistêmico; a facilidade que as novas tecnologias proporcionam para o estudo microbiano e suas interações; além da peculiaridade que compõem os ambientes de canga e toda exploração que este sofre, faz-se necessária a busca pela compatibilização entre o desenvolvimento econômico com a preservação desses ecossistemas. Com isso, este trabalho objetiva através de uma abordagem metaproteômica obter informações funcionais e filogenéticas das quatro fitofisionomias das áreas de canga ferruginosa da Serra dos Carajás, acreditando-se que estas possuem características distintas, específicas de cada ambiente. A criação de referências bioquímicas e moleculares deve servir de guia para as avaliações de impactos ambientais, como também para orientar estratégias no acompanhamento de projetos de recuperação de áreas degradadas ou validação de áreas de compensação ambiental e propor medidas de mitigação dos impactos causados pela mineração na região de Carajás.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Utilizar uma abordagem metaproteômica para obter informações funcionais e filogenéticas de quatro fitofisionomias da Serra de Carajás.

2.2. Objetivos Específicos

- a) isolar, identificar e quantificar proteínas de solos sob diferentes fitofisionomias da Canga de Carajás;
- b) detectar enzimas chave para manutenção dos ciclos biogeoquímicos (C, N, S e P) nos solos das fitofisionomias estudadas;
- c) averiguar o grau de similaridade do proteoma do solo nas fitofisionomias;
- d) verificar quais funções moleculares e rotas metabólicas são mais abundantes nos solos das diferentes fitofisionomias de canga.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A Província Mineral de Carajás

Situada no sudeste do Estado do Pará ($5^{\circ}54'-6^{\circ}33'$ S e $49^{\circ}53'-50^{\circ}34'$ W), a Província Mineral de Carajás é constituída por um complexo montanhoso, caracterizado pela riqueza de recursos minerais, relevo acidentado e presença de platôs de afloramentos de rochas ferruginosas isoladas (VIANA et al., 2016). Estes platôs estão sustentados em parte por coberturas lateríticas detríticas (cangas), constituídas essencialmente de fragmentos relictuais de hematita e magnetita, originadas a partir da alteração intempérica das formações ferríferas bandadas (*banded iron formations*, BIF) (BEISIEGEL et al., 1973).

Sobre as cangas de Carajás cresce uma vegetação baixa, com poucos indivíduos de porte arbóreo, apresentando um aspecto savânico e com a presença marcante de diversas espécies herbáceas, bem destacada da floresta tropical circunvizinha (NUNES, 2009). O aspecto aberto desta vegetação foi importante desde o início das pesquisas geológicas, pois serviu como indicador para as descobertas de minério da região (SILVA; SECCO; LOBO, 1996).

Em 1998, foi criada a Floresta Nacional de Carajás, unidade de conservação de uso sustentável, que abrange as principais montanhas da região de Carajás (MOTA et al., 2015). Outras áreas de proteção ambiental também foram estabelecidas no entorno, para a proteção da biodiversidade e serviços ecossistêmicos dos diferentes ecossistemas da região. O Mosaico de Carajás inclui a Floresta Nacional de Itacaiúnas, Floresta Nacional do Tapirapé-Aquiri, Reserva Biológica de Tapirapé, Área de Proteção Ambiental do Igarapé Gelado e Terra Indígena Xicrin do Catetê, somando aproximadamente 12.000 km² (VIANA et al., 2016). Criado em junho de 2017 o Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, que inclui as Serras da Bocaina e do Tarzan, é mais uma área de proteção somada a este complexo.

O clima atual da região se enquadra no tipo Aw de Köppen, possuindo como característica marcante um índice pluviométrico anual elevado e a presença de um período bem definido de estiagem. A temperatura média mensal varia entre 25,1°C e 26,3°C, sendo a mínima absoluta situada entre 15,6°C e 18,3°C e registrada entre os meses de julho e outubro, e a máxima entre 34,3°C e 38,1°C, que pode ocorrer nos demais meses (VIANA et al., 2016).

3.2 Canga e suas fitofisionomias

A região de Carajás compõe uma mistura de distintas paisagens, coexistindo dois ambientes fitogeográficos distintos: um tipicamente arbóreo, representado pela Floresta Ombrófila, ocupando a maior área; e outro representado por uma formação herbáceo-arbustiva, associado a afloramentos rochosos ricos em ferro, conhecida como vegetação de canga, ou campo rupestre ferruginoso, estando este localizado nos topos de montanhas (NUNES, 2009; SCHAEFER et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2016).

Canga é um termo brasileiro que se refere a um ecossistema associado a uma crosta superficial de ferro, presente nos estados de Minas Gerais e Pará (SKIRYCZ et al., 2014). Localizados em topo de montanhas, compostos por diversos microambientes como cavernas, lagoas, brejos, lajeados, fendas, poças e escarpas, os complexos rupestres, assim também conhecidos, possuem uma rica biodiversidade, bem como espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (JACOBI et al., 2007; SKIRYCZ et al., 2014; MOTA et al., 2015).

Severas condições edafoclimáticas como, alta radiação UV, variações térmicas diárias, elevada evapotranspiração e ventos fortes, desafiam a vegetação a se estabelecer nos solos de canga, os quais são rasos e ácidos, possuem baixa capacidade de retenção de água e são pobres nutricionalmente, além de possuírem elevados teores de metais pesados (SILVA, 1992; JACOBI; DO CARMO; VINCENT, 2008; SKIRYCZ et al., 2014; NUNES et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2016). Tais condições extremas ocasionaram o desenvolvimento de mecanismos de sobrevivência das espécies ali adaptadas, as quais apresentam particularidades fisiológicas, morfológicas e reprodutivas (GIULIETTI et al., 1987). Espécies metalófitas, por exemplo, são caracterizadas por possuírem altas concentrações de metais pesados em seus tecidos, o que pode eventualmente influenciar na estatura das plantas que desenvolvem nanismo ou gigantismo (PORTO; SILVA, 1989).

Dentro da Serra dos Carajás algumas fitofisionomias se individualizam, contudo, formas intermediárias entre elas são comuns, e muitas espécies ocorrem em mais de uma dessas fitofisionomias (MOTA et al., 2015). Para este trabalho foram adotadas classificações fitofisionômicas descritivas, considerando as quatro de maior predominância nas áreas de canga, e tendo como base a classificação feita por Schaefer et al., (2016), os quais consideram os aspectos morfológicos, físicos e químicos, para a caracterização de geoambientes (figura 1).

- Campo Rupestre de *Vellozia* (CRV): Solos rasos, bem drenados, ricos em matéria orgânica sobre camada contínua de canga, abundância de termiteiros. Estrato arbustivo-herbáceo com abundância dos gêneros *Axonopus*, *Vellozia*, *Sobralia*, *Ipomea* e *Andropogon*.
- Campo Rupestre Arbustivo (CRA): Solos rasos, bem drenados, com bolsões de matéria orgânica nas fraturas da camada de canga, abundância de termiteiros. Estrato arbustivo com abundância dos gêneros *Callisthene*, *Byrsonima*, *Bauhinia*, *Alibertia* e *Mimosa*.
- Campo Graminoso (CG): Solos rasos, moderadamente drenados, ricos em matéria orgânica, sobre camada contínua de canga. Apresenta estrato graminóide, com predominância das famílias Xyridaceae, Cyperaceae, Gramínea e Eriocaulaceae.
- Capão Florestal (CF): Solos profundos, bem drenados, com quantidade expressiva de fragmentos de canga (concreção) do tamanho de areia e silte, teores altos de fósforo quando próximos a cavernas. Estrato arbóreo com abundância dos gêneros *Pouteria*, *Sacoglottis*, *Myrcia*, *Miconia*, *Ficus* e *Cupania*.

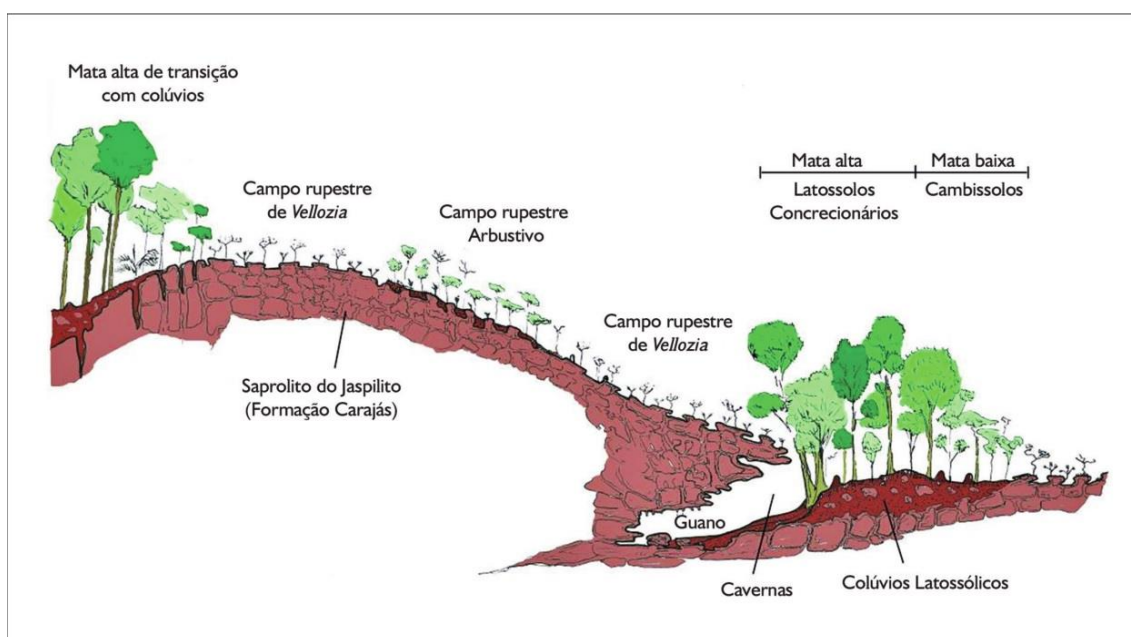


Figura 1 – Corte esquemático da paisagem típica da Serra dos Carajás, ilustrando alguns dos geoambientes bem drenados e solos associados. Fonte: Schaefer et al., 2016.

3.3 Importância da microbiota para manutenção dos ecossistemas

A diversidade florística está associada à variação de condições ambientais, principalmente as relacionadas ao solo, que condicionam a coexistência de espécies vegetais, com diferentes exigências ecológicas (DICK; SCHUMACHER, 2015). As comunidades microbianas que habitam o solo exercem papéis fundamentais, mediando interações entre planta e solo e contribuindo para a adaptação de plantas heterogêneas e com diferentes funções ecossistêmicas (MONTEIRO et al., 2004).

O solo é considerado um importante compartimento da biosfera, atuando não somente como base para a atividade agrícola, mas também na manutenção da qualidade do ambiente local, regional e global (GLANZ, 1995). Devido sua natureza heterogênea, complexa e dinâmica, o solo é um habitat excepcionalmente peculiar, viabilizando a coexistência de organismos com metabolismos distintos, que interagem de modo dinâmico e em equilíbrio, propiciando desse modo condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As características intrínsecas de cada habitat são determinantes para a diversidade, densidade e funcionalidade da comunidade microbiana e o êxito de tais comunidades é decorrente da extensão e rapidez de suas respostas fisiológicas às condições ambientais predominantes, bem como de sua elasticidade metabólica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os microrganismos presentes no solo atuam como fonte e dreno de nutrientes em todos os ecossistemas. Possuem papel fundamental na decomposição da serapilheira e ciclagem dos nutrientes, estrutura do solo, fixação biológica de N_2 , associações micorrízicas, controle biológico de fitopatógenos e outras alterações do solo que influenciam o crescimento vegetal (KENNEDY; SMITH, 1995; MELLONI, 2007).

Os processos mediados biológica e bioquimicamente no solo são fundamentais para o funcionamento do ecossistema terrestre (KANDELER, 2007). A vida no planeta tem como base dois processos principais opostos: a fotossíntese, realizada pelos autotróficos (produtores primários), e a decomposição seguida da mineralização dos materiais orgânicos por ela formados, feita pelos heterotróficos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os processos de decomposição de resíduos orgânicos são estudados em três diferentes níveis de resolução: molecular, organizacional e populacional, devendo haver a integração destes para total compreensão das funções microbianas no solo (KANDELER, 2007).

3.4 Metaproteômica

Os microrganismos que compõem a biota do solo são variados em relação a espécies, funções, interações, habitat, fisiologia e nutrição, entre outros aspectos (STAMFORD et al., 2005). Entre todos os compartimentos ambientais naturais, os solos provavelmente contêm a maior biomassa e diversidade microbiana, o que os classificam como um dos habitats mais desafiadores para os microbiologistas (LIU et al., 2017). Entretanto, segundo Blagodatskaya e Kuzyakov (2013) apenas uma pequena fração da biomassa microbiana do solo encontra-se usualmente ativa (0,1-2%).

A ecologia microbiana tem tido novos avanços em decorrência do desenvolvimento de técnicas moleculares baseadas no DNA, as quais permitem o estudo da estrutura microbiana, verificando a abundância de genes relacionados a um determinado grupo envolvido em uma via metabólica (BASTIDA et al., 2009). A metagenômica fornece um catálogo extenso de informações genômicas que podem ser traduzidas em uma lista de todos os produtos protéicos possíveis (HETTICH et al., 2012). Fornece, portanto, uma descrição fundamental dos genes funcionais e da filogenia de toda a comunidade microbiana (BASTIDA; JEHLICH, 2016b). Desse modo, a informação metagenômica representa o "potencial funcional" do ambiente. Entretanto, análises baseadas em DNA não produzem inferências em relação à atividade dos genes em questão. Portanto, para avaliar a função e ligar a biodiversidade ao funcionamento do ecossistema, é de extrema importância não apenas medir a abundância de genes, mas também a expressão (mRNA) e o acúmulo diferencial de proteínas (PROSSER, 2015; DELGADO-BAQUERIZO et al., 2016; KEIBLINGER et al., 2016). A metaproteômica é uma técnica que possibilita a identificação do acervo proteico presente em determinado ambiente, sendo este a ligação direta ao potencial catabólico dos microrganismos (HETTICH et al., 2013). Há, então, a compreensão da relação existente entre as funções filogenéticas da comunidade microbiana com os processos funcionais do solo (BASTIDA; JEHLICH, 2016b).

Contudo, alguns fatores dificultam a extração de proteínas de solos tais como a presença de outros compostos orgânicos: carboidratos complexos; lipídios; compostos fenólicos (lignina); substâncias húmicas; e também compostos inorgânicos da matriz do solo, como o silte e minerais de argila (KEIBLINGER et al., 2016). Depois de extraídas, outro obstáculo é a identificação e caracterização das proteínas, pois isto depende do design, capacidade e qualidade do banco de dados escolhido (WANG et al., 2016). Muitos

sequenciamentos da microbiota edáfica ainda não foram divulgados e assim há pouca correspondência com bancos de dados públicos tais como NCBI ou Uniprot (WILMES; BOND, 2006). Para contornar este problema está sendo criado um banco de dados baseado em sequenciamento *shotgun* de DNA e anotação funcional dos genes que codificam proteínas baseada em descrições do InterProScan (FINN et al., 2017).

Espera-se, portanto, que através da associação dos dados de metagenômica e metaproteômica se obtenham maiores informações sobre a composição filogenética e funcional dos solos de canga ferruginosa da Serra dos Carajás. Isto deve proporcionar a interpretação do funcionamento dos processos que ocorrem no solo, com o foco em interações microbiota-solo-planta. Assim deve ser possível identificar as espécies existentes nos solos de cada fitofisionomia que compõem a canga, comprovando a relação direta da diversidade microbiana com o mosaico vegetal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de Amostragem

Nos estudos que definiram o Distrito Ferrífero de Carajás (RESENDE; BARBOSA, 1972), a Serra dos Carajás foi setorizada em quatro conjuntos principais de serras: Serra Norte (platôs N1 a N9); Serra Sul (platôs S1 a S45); Serra Leste (platôs SL1 a SL3) e Serra de São Félix (platôs SF1 a SF3). Alguns platôs recebem nomes específicos, como a Serra da Bocaina e Serra do Tarzan, ambas pertencentes a Serra Sul (figura 2) (MOTA et al., 2015).

As amostras foram coletadas nas Serras Norte, Sul e Bocaina, em áreas de canga nativa.

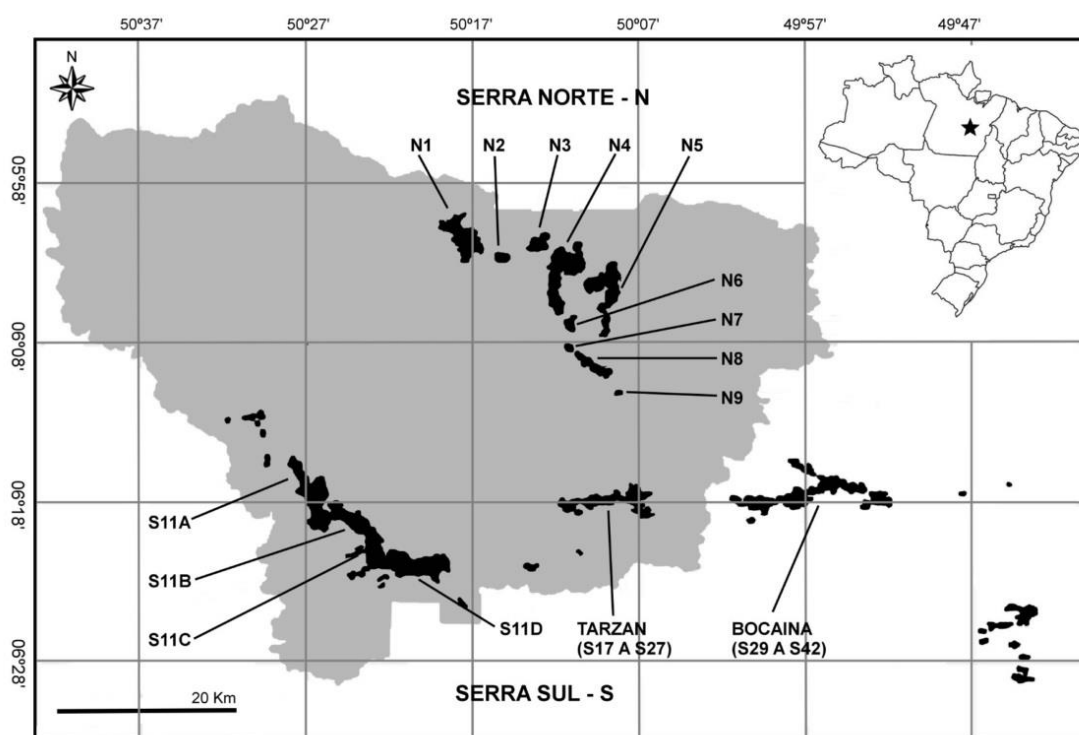


Figura 2 – Localização da região da Serra dos Carajás (estrela), limites da FLONA Carajás (cinza) e identificação dos principais afloramentos ferruginosos (preto) estudados nas áreas de canga. Fonte: Viana et al., 2016.

4.2 Amostras de Solo

As amostras foram coletadas no período chuvoso do ano de 2017, pela equipe de recuperação de áreas degradadas do Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável, na Serra dos Carajás (áreas da Serra Norte, Serra Sul e Bocaina), representando áreas de quatro diferentes fitofisionomias. Foram realizados transectos de aproximadamente 300 metros, e demarcadas parcelas de 20x10m, sendo quatro parcelas por transecto. Cada parcela

compreende a uma fitofisionomia, entretanto nem todos os transectos contêm as quatro fitofisionomias. Em cada parcela foi coletada uma amostra de solo superficial (0–5 cm) composta por cinco pontos de amostragem. Após coletadas, as amostras foram armazenadas a -80°C.

Foram coletadas um total de 48 amostras (tabela 1), entretanto com o intuito de padronizar a quantidade de amostras para que se obtivesse uma análise mais coerente de dados, adotou-se a menor quantidade de amostras que continha uma fitofisionomia. Ao final deu-se continuidade nas análises com oito amostras por ambiente, totalizando 32.

Tabela 1 – Quantidade de amostras coletadas por fitofisionomia das áreas de canga da Serra dos Carajás.

Fitofisionomia	Amostras
Campo Graminoso	11
Campo Rupestre <i>Vellozia</i>	13
Campo Rupestre Arbustivo	16
Capão Florestal	8

4.3 Extração de proteínas do solo

A extração de proteínas foi realizada utilizando método proposto por (WANG et al., 2006) que inclui etapas de pré-limpeza para remover contaminantes que afetam a separação (lavagem de ácido tricloro-acético /acetona) e adicionalmente remover compostos (poli)fenóis (lavagem de metanol).

Foram pesadas aproximadamente 3 g de solo e dispostas em falcons de 15 mL, posteriormente foi adicionado 10 mL de tampão contendo sacarose (1,5 M), Tris-HCL (1 M, pH 8), SDS (dodecilsulfato de sódio, 10%), PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil, 100 mM), PVPP (polivinilpolipirrolidona) e H₂O ultrapura, em seguida adicionou-se 10 µL de inibidor de proteases (Protease Inhibitor cocktail - P8340 Sigma-Aldrich) e 500 µL de β-mercaptoetanol, sendo deixadas então no gelo por 10 minutos.

As amostras foram submetidas à sonicação por seis repetições de 30 segundos, com intervalos de aproximadamente 30 – 60 segundos, ou até que a mesma esfriasse, evitando o aquecimento. Em sequência, a amostra contida em cada falcon foi dividida em oito

eppendorfs (epp) de 2 mL, transferindo aproximadamente 1000 μ L da amostra em cada epp, e adicionados 700 μ L de fenol em cada epp.

As amostras foram homogeneizadas durante 15 minutos em um vortex, em seguida centrifugadas por sete minutos, 18228 g a 4°C, para que houvesse a separação da fase fenólica, a qual foi transferida para um epp novo. Repetiu-se o processo de centrifugação para que fossem eliminados quaisquer resíduos da fase aquosa ou de SDS. Finalizou-se esta primeira etapa com a transferência de 700 μ L do sobrenadante para um novo epp e adicionou-se outros 700 μ L de acetato de amônia em metanol, para a precipitação das proteínas, vortexou-se as amostras rapidamente apenas para misturá-las e as armazenou à -80°C overnight.

Para a limpeza das amostras, as mesmas foram submetidas a repetidas etapas de lavagem. Inicialmente centrifugou-se as amostras por 20 minutos, 18228g a 4°C, descartou-se todo o líquido, adicionou-se 1500 μ L de acetona 80%, pipetou-se continuamente para que o pellet se dissolvesse, transferiu-se para um novo epp, vortexou rapidamente e centrifugou por sete minutos, 18228 g a 4°C. Repetiu-se o processo por três ou quatro vezes e executou-se uma última lavagem, porém utilizando etanol 70%, centrifugando por outros sete minutos, depois descartou-se todo o líquido e secou-se as amostras. Após secas, adicionou-se 200 μ L de ureia 7 M tiourea 2 M, pipetando repetidamente para que ocorresse a dissolução do pellet. Realizou-se a quantificação das proteínas através do Qubit 2.0 (Invitrogen); e então armazenou-se as amostras à -80°C.

4.4 Digestão das proteínas

A digestão de proteínas foi realizada utilizando 50 μ g de proteína de cada amostra, sendo completadas com ureia 8 M para um volume final de 150 μ L cada. O preparo da digestão foi realizado inicialmente com a redução de proteínas com ditioneitol (DTT, 5 mM), incubando-as por 25 minutos a 56°C; em seguida realizou-se a alquilação com a adição de iodoacetamida (IAA, 14 mM), deixando agir por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, ocorre a etapa de remoção de IAA residual, adicionando novamente DTT 5 mM, com incubação de 15 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 1:5 de bicarbonato de amônio 50 mM, seguida pela adição de CaCl₂ 1 mM. O tratamento foi realizado com tripsina (20 ng/ μ L⁻¹) por 16 horas à 37°C. Para interromper a reação enzimática, adicionou-se ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4% do volume

das amostras, e verificou-se então se o pH se encontrava ≤ 3 , caso não esteja, adiciona-se mais TFA até que se atinja tal valor.

4.5 Dessalinização das amostras

Para a dessalinização das amostras foram utilizadas colunas Sep-Pak C18 de 50 mg de fase sólida e 1 mL de capacidade. Ativou-se as colunas com 3 mL de acetonitrila (ACN) 100%, em seguida equilibrou-as com 1 mL de ACN 50% contendo 0,1 % de ácido fórmico, e 3 mL de TFA 0,1%. Em sequência, as colunas foram carregadas com as amostras individualmente e lavadas com 3 mL de TFA 0,1%, sendo equilibradas com 1 mL de ácido fórmico 0,1%. Realizou-se a eluição com 2 mL de ACN 50% e 1 mL de ACN 80%, contendo 0,1 % de ácido fórmico. Por fim, as amostras foram secas em concentrador a vácuo e ressuspensas em 50 μ L de formiato de amônio 10 mM.

4.6 Cromatografia Líquida Bidimensional acoplada a Espectrometria de Massa

Foi utilizado o cromatógrafo Nano Acquity UPLC (Waters), configurado para um fracionamento em duas dimensões. Para a primeira dimensão foi utilizada uma coluna analítica de 5 μ m XBridge BEH130 C18 (300 μ m x 50 mm) em um fluxo de 2 μ L por minuto. A segunda dimensão foi montada com uma coluna trap C18,5 μ m (180 μ m x 20 mm) e uma coluna analítica 1.7 μ m BEH130 C18 μ m (100 μ m x 100 mm) em um fluxo de 400 nL.min.⁻¹. As amostras foram separadas em cinco frações a partir de um gradiente de 10.8, 14.0, 16.7, 20.4, e 65.0% de ACN.

O cromatógrafo foi 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. Foram adquiridos espectros de massas dentro da faixa de 50 a 1200 Da, com scan de 0,5 segundos e um intervalo entre scans de 0,1 segundos. A largura do pico e resolução dos espectros de massas foram configurados no modo automático. O peptídeo (lockmass) [Glu-1]-fibrinopeptídeo, de massa 785.4827 Da e cargas +2, foi utilizado como referência e lido a cada 30 segundos (segundo configurações do lockmass spray).

4.7 Bioinformática

Os dados brutos oriundos da espectrometria de massas foram processados no ProteinLynx Global Server 3.0.2 (Waters). Para a quantificação e identificação de proteínas utilizamos a plataforma Mascot (PERKINS et al., 1999). Para tal faz-se necessário um banco de dados de peptídeos trópticos, o qual foi montado a partir de dados de metagenômica utilizando o montador MegaHit (LI et al., 2015), o qual foi escolhido após análises de montagens entre este e o Spades. Para isto, criou-se um arquivo texto composto por sequências do proteoma predito pelas análises metagenômicas, ou seja, todas as possíveis proteínas que o genoma pode codificar. Para o banco de dados foram utilizados dados de oito amostras, duas por fitofisionomia, sendo utilizado como critério a qualidade da montagem de cada uma delas sendo: i) maior contig; ii) maior valor de N50; iii) maior quantidade de bases; e iv) a quantidade de contigs ≥ 500 pb. Após a montagem do arquivo texto, este foi utilizado como referência para identificação e quantificação de proteínas presentes na amostra.

A análise funcional e enzimática das proteínas identificadas foi realizada utilizando a plataforma Unipept (<https://unipept.ugent.be/>) (MESUERE et al., 2015). Foi utilizado como arquivo de entrada uma lista contendo as sequências dos peptídeos identificados por cada fitofisionomia, e desse modo obteve-se quais enzimas estão presentes na amostra, e também a ontologia genética (*gene ontology*), sendo esta dividida em três categorias: i) processos biológicos; ii) componente celular; e iii) função molecular. A plataforma KEEG (KANEHISA et al., 2018) foi utilizada para o mapeamento das enzimas em rotas metabólicas. A anotação funcional das proteínas foi feita através da ferramenta InterProScan (MITCHELL et al., 2019) (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) e a anotação taxonômica foi feita através do software Kaiju (MENZEL; NG; KROGH, 2016), utilizando arquivo fasta com sequências de nucleotídeos do metagenoma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação e distribuição de proteínas

Com a análise de 32 amostras de quatro fitofisionomias que compõem os ambientes de canga nativa da Serra dos Carajás, obtivemos um total de 3760 proteínas; sendo que 249 são encontradas em mais de uma amostra e 3511 aparecem apenas uma vez, estando estas distribuídas da forma como ilustra a figura 3a. Através da ferramenta InterProScan realizou-se a anotação funcional dessas proteínas, obtendo então um total de 1328 anotações. Apesar das quatro fitofisionomias coexistirem na Serra dos Carajás, é notável a grande quantidade de proteínas exclusivas presentes em cada ambiente (figura 3b). Isto demonstra o quanto essas paisagens se distinguem do ponto de vista da diversidade das proteínas, o que de fato é esperado já que cada ambiente possui estrutura e composição pedológica além de mosaico vegetal distintos.

Ficou clara também a necessidade de um maior número de réplicas analíticas para representar o proteoma de cada amostra. Segundo Greenfield et al., (2018), diferentes métodos de extração apresentam diferentes taxas de recuperação de proteína e isto depende do tipo de solo. Eles avaliaram diferentes métodos utilizando três tipos de solo e obtiveram resultados variando de 10 a 80% de recuperação de proteínas. Aliado a isto há a necessidade de técnicas analíticas mais eficazes. Existem diferentes tipos de espectrômetros de massa com resolução e sensibilidade variável (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014). Equipamentos com maior resolução tendem a cobrir uma maior parte do proteoma detectável e isto é altamente desejável para aprimorar o alcance e a robustez da metaproteômica de solos. Adicionalmente, o uso de uma base de dados confiável, baseado em metagenoma é fundamental para a identificação do maior número de proteínas e subsequente anotação funcional. Por exemplo, apenas conseguiu-se recuperar informações funcionais de 35,3% do total do proteoma deste trabalho. Desse modo a metaproteômica dos solos de canga, os quais são pobres nutricionalmente, rasos, com baixa retenção de água, e demais outras características que o caracterizam muitas vezes como um ambiente de condições extremas, se torna ainda mais laborioso.

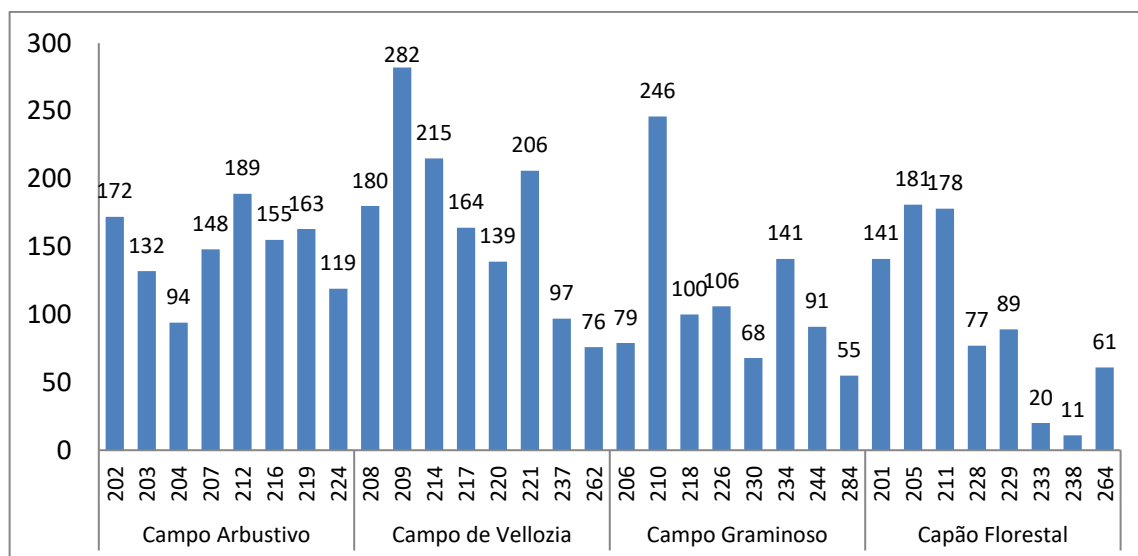


Figura 3a – Total de proteínas por amostras de solo identificadas por espectrometria de massas e suas respectivas fitofisionomias as quais compõem a Serra dos Carajás. Os números no eixo X representam o código das amostras no ITV já os números do eixo Y representam a quantidade de proteínas identificadas por amostra.

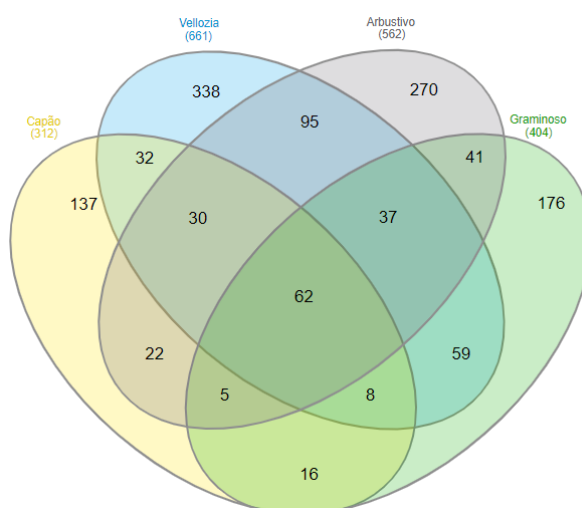


Figura 3b – Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas detectadas nas amostras dos solos de canga por fitofisionomia.

A diversidade filogenética foi inferida através da anotação feita pelo software Kaiju. Corroborando o diagrama anterior, a distribuição filogenética apresenta maior número de organismos distintos entre as fitofisionomias (figura 4), nos dando a entender que as proteínas únicas são oriundas de diferentes microrganismos. Isso nos confirma a hipótese de que as áreas que constituem os campos ferruginosos possuem composições biológicas distintas, consequentemente gerando um proteoma específico para cada paisagem. Nota-se também que

em ambas as representações, os Campos Arbustivo e *Vellozia* apresentam maior semelhança entre eles em comparação com os demais.

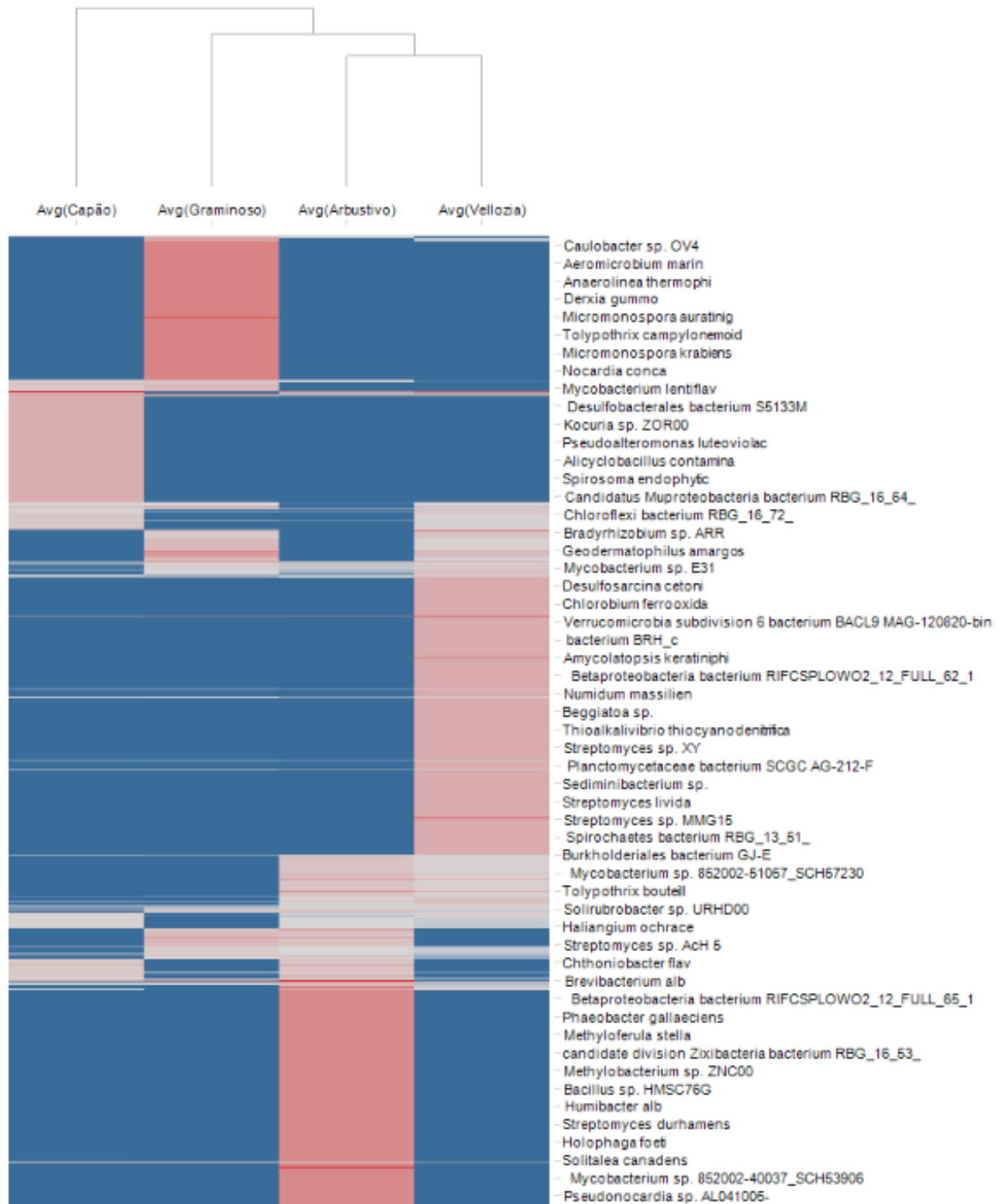


Figura 4 – *Heatmap* ilustrando a distribuição da filogenia dos microrganismos presentes nos solos de canga por fitofisionomia. No topo da imagem tem-se um dendrograma demonstrando o agrupamento que há nos Campos de *Vellozia* e Arbustivo, tendo como base a filogenia em questão.

5.2 Categorização Funcional

Através da ferramenta Unipept, utilizando como entrada as sequências de peptídeos identificados, foram obtidas informações funcionais dos solos das cangas da Serra dos Carajás (figura 5). A Ontologia Genética (*gene ontology*) define o universo de conceitos relacionados às funções gênicas e como essas funções estão relacionadas umas às outras. Esses grupos se dividem em três aspectos: função molecular (atividades de nível molecular realizadas por produtos genéticos), componente celular (as localizações relativas a estruturas celulares nas quais um produto gênico desempenha uma função) e processo biológico (os processos maiores, ou 'programas biológicos' realizados por múltiplas atividades moleculares) (ASHBURNER et al., 2000).

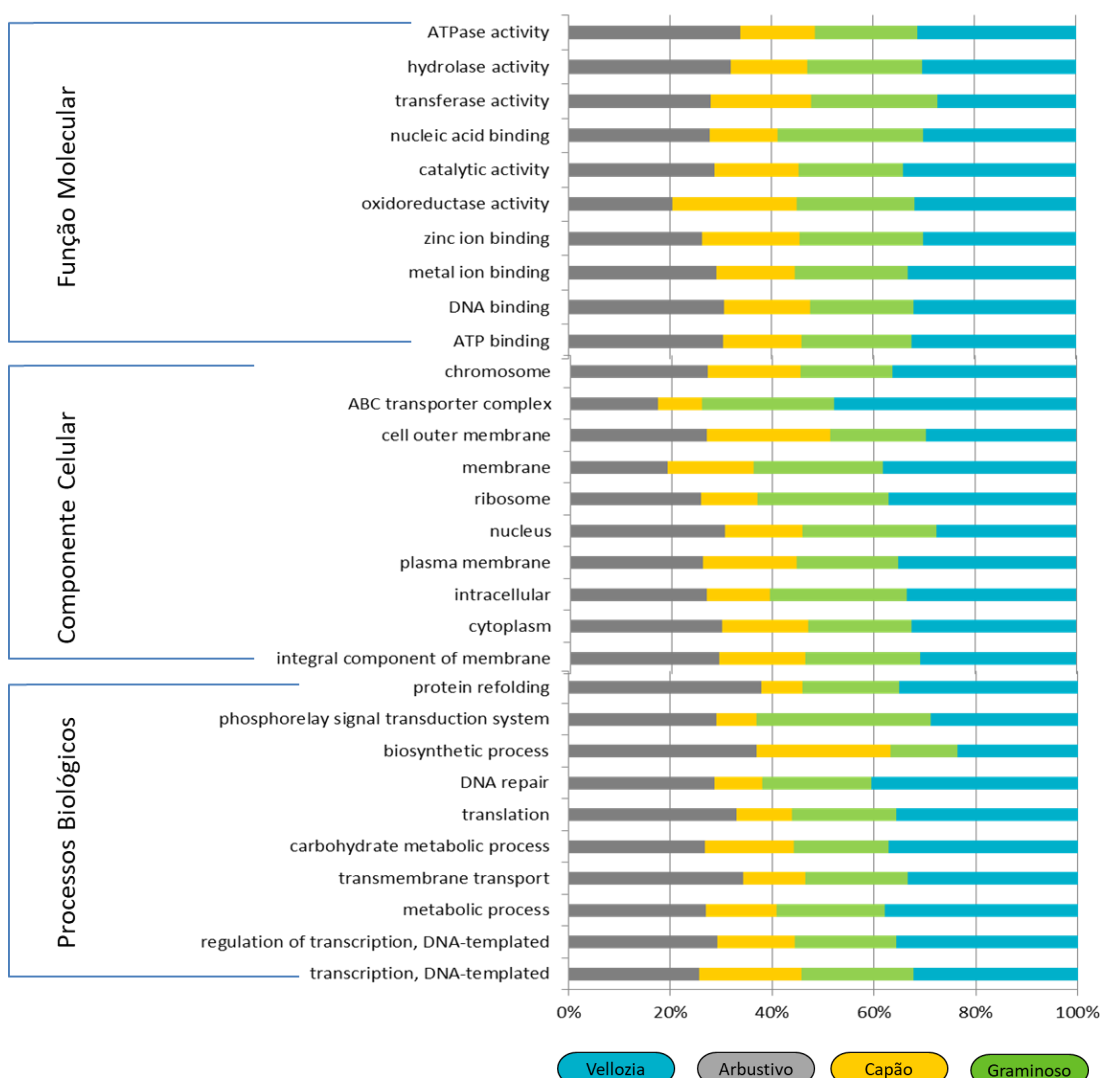


Figura 5 – Os top 10 das funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos, mais abundantes nos solos de canga em cada fitofisionomia, estes foram identificados através da sequência de peptídeos.

Os peptídeos identificados foram agrupados em 906 categorias funcionais considerando todo o proteoma dos solos de canga. A grande maioria das funções é exclusiva de cada área, porém, com poucos peptídeos associados. A maioria dos peptídeos identificados se encontra distribuídos em poucas funções moleculares. Analisando as 10 funções mais abundantes, a função “ligação de ATP” foi a mais bem representada (824 sequências), seguida de “ligação de DNA” (589 sequências) e “ligação a íons metálicos” (369 sequências). Juntas, essas categorias representam o equivalente a 66% dos peptídeos detectados em todo o experimento. Destas funções pode-se inferir a respeito de processos relacionados a produção de energia e expressão gênica, provavelmente relacionadas a mudanças constantes que podem estar acontecendo no ambiente. As concentrações significativas de metais pesados no solo de canga (SILVA, 1992), podem explicar o grande número de peptídeos na função “ligação a íons metálicos”. Outras funções como ligações a íons de zinco, atividades oxido-redutivas, catalíticas, e atividades enzimáticas também se destacaram.

Os componentes celulares nos disponibilizam informações a respeito da provável localização da proteína (se este está dentro e/ou fora da célula ou em qual compartimento específico, como uma organela ou núcleo celular). Os peptídeos identificados estão possivelmente distribuídos em 219 componentes celulares. Analisando os 10 componentes de maior abundância, pôde-se observar que a maioria dos peptídeos identificados é de proteínas de membrana (954), o que pode estar relacionado com um grande número interações entre a célula e o ambiente. Trocas sucessivas de sinais e nutrientes entre os microrganismos e entre eles e a vegetação, por exemplo. As proteínas de membrana também desempenham papéis importantes em bactérias gram-negativas, mitocôndrias e cloroplastos no transporte de nutrientes, importação de proteínas, secreção e outros processos biológicos essenciais (GU et al., 2016). Um total representativo de proteínas está presente em outros componentes básicos como citoplasma (516), componentes intracelulares (215) e membrana plasmática (179).

Dentre os 810 processos biológicos detectados, apenas 75 são comuns a todas as paisagens. Entretanto, a maior concentração dos peptídeos se apresenta, assim como as demais categorias já citadas, em uma quantidade reduzida de processos. Os três de maior destaque são transcrição de DNA (254), regulação da transcrição do DNA (151) e processos metabólicos (137). Os dois primeiros estão relacionados a expressão gênica. Transporte transmembrânico, tradução e reparação de DNA também foram detectados, bem como

sistema de transdução de sinal de fosforilação, refletindo desse modo a comunicação entre microrganismos e ambiente circundante.

De modo geral, as categorias funcionais identificadas representam reações relacionadas a processos fundamentais da célula, além de comunicação entre os organismos e estratégias de sobrevivência em ambientes extremos. O fato de Capão Florestal possuir o menor número de peptídeos por categoria nos indica que esse ambiente, por exemplo, fornece condições mais estáveis para os microrganismos. Este ambiente possui solos mais profundos, maior quantidade de matéria orgânica (SCHAEFER et al., 2016), maior disponibilidade de nutrientes (MITRE et al., 2018), proporcionando assim um ambiente melhor estruturado, mais favorável para os microrganismos, não havendo a necessidade de desenvolver atividades de competição e defesa.

5.3 Enzimas presentes nos solos de canga

As enzimas são conhecidas por desempenhar um papel substancial na manutenção da saúde do solo e do ambiente circundante (DAS; VARMA, 2010). Importantes funções do solo são mediadas e catalisadas por enzimas, como: decomposição de insumos orgânicos, transformação de matéria orgânica, liberação de nutrientes inorgânicos para o crescimento das plantas, fixação de N_2 , nitrificação, desnitrificação, e desintoxicação de xenobióticos (DICK, 1997). Todas as reações bioquímicas são catalisadas por enzimas, tornando-as adequadas como indicadores de atividade biológica (ALKORTA et al., 2003). As enzimas são divididas em seis grupos, como exemplificadas na figura 6, estando todos representados nos ambientes de canga. Percebe-se que há uma maior predominância dos grupos de transferases e hidrolases em todas as fitofisionomias, se sobressaindo os Campos Rupestres (*Vellozia* e *Arbustivo*).

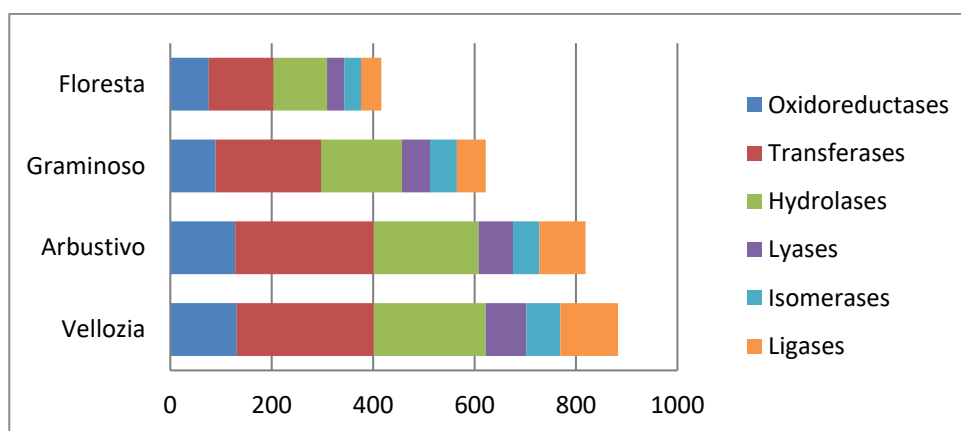


Figura 6 – Quantidade de peptídeos identificados pertencentes aos grupos enzimáticos por fitofisionomia.

Enzimas do solo mais comumente estudadas são as hidrolases, como fosfatases, sulfatases, β -glucosidase ou β -galactosidase e urease como índices de P, S, C e N, respectivamente (KARACA et al., 2010). Estas enzimas hidrolisam várias ligações químicas na matéria orgânica, liberando formas inorgânicas de fosfatos ou sulfatos, ou hidratos de carbono sendo utilizados como fontes de energia pelos organismos do solo (ACOSTA-MARTINEZ; CANO; JOHNSON, 2018). Nos solos de canga foram detectadas enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases (figura 7) relacionadas à ciclagem dos principais nutrientes.

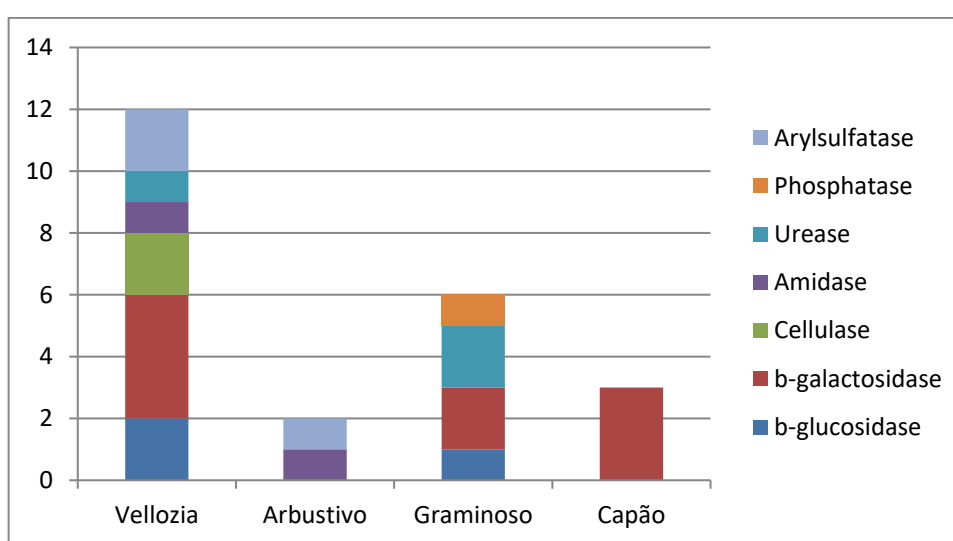


Figura 7 – Número de peptídeos das principais enzimas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos dos elementos C, N, P e S, presente nos solos de canga.

Como a atividade das enzimas do solo é específica do substrato e está relacionada a reações específicas, a medição de um grupo de enzimas é necessária para determinar o estado geral dos nutrientes ou determinar os índices de atividade microbológica (NANNIPIERI et al., 2012). Enzimas hidrolíticas, principalmente aquelas envolvidas em reações-chave nos ciclos de C, N, P e S, são comumente usadas como indicadores biológicos principalmente porque os organismos decompositores de detritos orgânicos são provavelmente os principais contribuintes para a atividade enzimática do solo (ALKORTA et al., 2003).

Nos solos de canga foram encontradas tais enzimas relacionadas ao ciclo do C: β -glucosidase e β -galactosidase, as quais desempenham fundamental papel no solo. Estas são enzimas limitantes da taxa de degradação microbiana da celulose à glicose, uma importante fonte de energia de C para a vida de microrganismos e, também estão envolvidas em catalisar

a hidrólise de vários β -glucósidos presentes em detritos de plantas em decomposição no ecossistema do solo (TABATABAI, 2003; UTOBO; TEWARI, 2015). A celulase também está relacionada com o ciclo do C, desempenhando o papel de catalisar a hidrólise da celulose em D-glucose (HUSSAIN et al., 2009). A amidase hidrolisa as ligações C-N das amidas, liberando amônia, importante para a mineralização de nitrogênio e para disponibilização de nutrientes para as plantas (ALKORTA et al., 2003). A urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia em CO_2 e NH_3 com um mecanismo de reação baseado na formação de carbamato como intermediário, o que leva a um aumento no pH do solo e perda de N para a atmosfera através da volatilização do NH_3 . (TABATABAI, 2003; DAS; VARMA, 2010). Relacionada ao ciclo do P, a fosfatase libera fosfato disponível na planta a partir de matéria orgânica e sua secreção é regulada como resposta a condições exógenas do solo, como a deficiência de fosfato (TADANO et al., 1993). A arilsulfatase está relacionada com o ciclo do S. Esta libera sulfato disponível para a planta a partir de matéria orgânica, muitas vezes um nutriente limitante para plantas e microrganismos (KERTESZ; MIRLEAU, 2004).

É significativa a diversidade dessas enzimas nos solos de *Vellozia*, que possui todas as enzimas descritas com exceção da fosfatase; a qual, somente foi encontrada no Campo Graminoso, segunda paisagem com maior diversidade enzimática. Enquanto que no Capão Florestal foi possível detectar apenas a enzima β -galactosidase. Isto é um forte indício que a atividade microbiana e ciclagem de nutrientes deve estar mais ativa e conservada nos Campos Rupestres de *Vellozia*.

5.4 Agrupamento de proteínas em rotas metabólicas

As vias ou rotas metabólicas são uma série de reações químicas onde o produto final de uma reação serve de substrato para uma próxima e são catalisadas por enzimas. Utilizando da ferramenta KEGG, obteve-se a distribuição por fitofisionomia das proteínas identificadas em rotas metabólicas conhecidas (figura 8). A detecção de várias enzimas dentro de uma rota metabólica é um forte indício de sua atividade no ambiente em questão. Foram identificadas 208 rotas metabólicas no total, destas, 91 são comuns a todas as fitofisionomias. O total de rotas por área possuem valores próximos, assim como as vias metabólicas exclusivas de cada fitofisionomia, divergindo apenas por *Vellozia*, que sobressai com quantidades maiores.

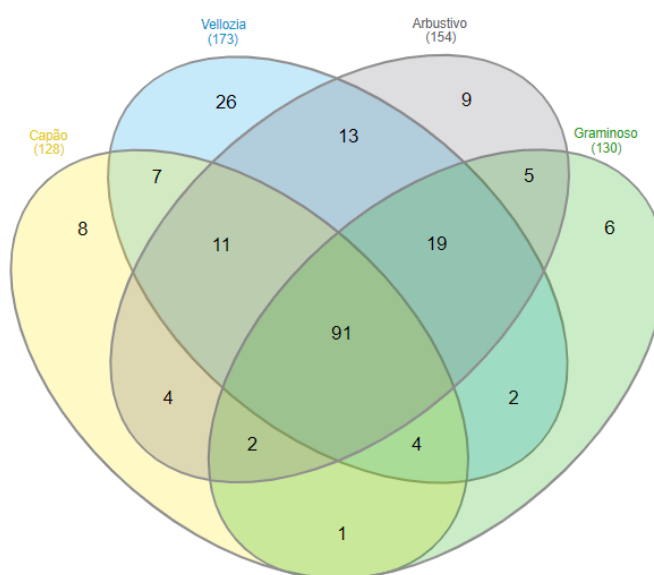


Figura 8 – Diagrama de Venn, ilustrando a quantidade e a distribuição das vias metabólicas ativas nos solos de canga entre as fitofisionomias da Serra dos Carajás.

Apesar da divergente distribuição proteica e filogenética dentre as fitofisionomias (mencionada anteriormente), pôde-se verificar que a maioria das vias metabólicas existentes coincide em todas as paisagens (figura 9). Ou seja, apesar desses ambientes possuírem características próprias, composição taxonômica diferente e produtos diversos, estes desenvolvem em sua grande maioria atividades microbiológicas funcionais similares. Isto nos leva ao conceito de redundância funcional, o qual alega que apesar da alta diversidade microbiana, a maioria das principais reações biogeoquímicas é impulsionada por um conjunto limitado de vias metabólicas de transdução de energia, cada uma das quais é encontrada em uma variedade de clados microbianos (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008). Isto é, microrganismos distintos podem exercer as mesmas funções dentro de determinado ambiente, e a diversidade funcional, por sua vez, é vinculada aos atributos físico-químicos do solo, como textura, umidade, pH, acidez, disponibilidade de água e nutrientes, além da vegetação presente em tal ambiente (Dick and Schumacher, 2015).

Também é possível observar novamente o agrupamento entre as fitofisionomias Arbustivo e *Vellozia*, através do dendrograma (figura 9) que possui como base a quantidade de proteínas presente em cada via metabólica.

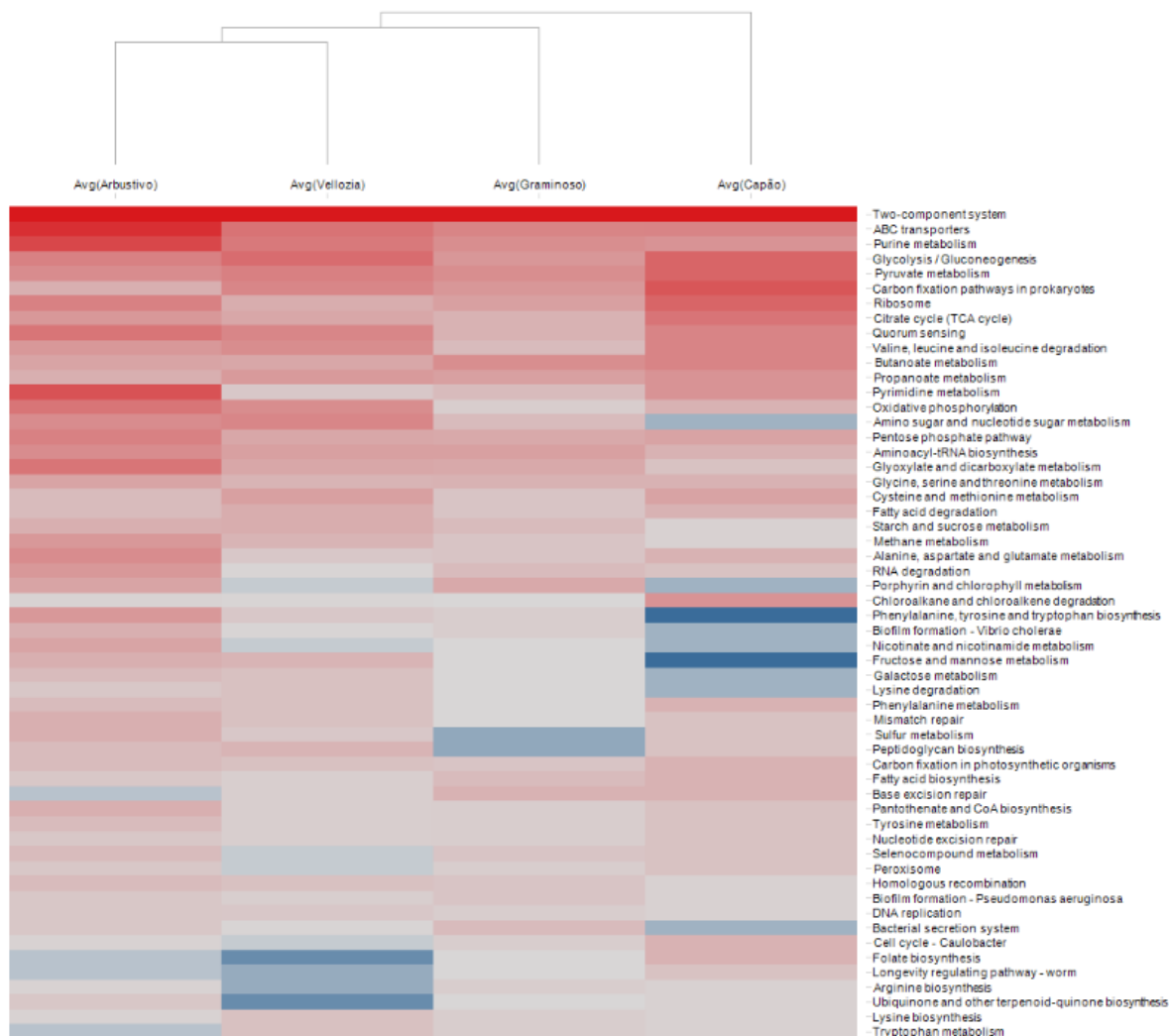


Figura 9 – Ao topo da imagem tem-se um dendrograma, onde mostra o agrupamento das fitofisionomias dos Campos Rupestres Arbustivo e *Vellozia*. Abaixo segue um *heatmap* que ilustra a intensidade baseado na quantidade de enzimas presentes nas rotas metabólicas existentes, demonstrando a proximidade entre as funções ativas moleculares nos solos de canga.

5.5 Two-component system: Via de sinalização bacteriana

A via metabólica com maior número de componentes identificados é a *two-component system* (TCS). Esta é um sistema de transdução de sinais que permite que as bactérias percebam, respondam e se adaptem às mudanças em seu ambiente ou em seu estado intracelular. Cada TCS consiste de um sensor de histidina quinase de proteína e um regulador de resposta (KANEHISA et al., 2018). Como já dito, os solos de canga possuem características particulares constituindo um ambiente com condições extremas e de baixa estabilidade, exigindo, portanto uma maior sensibilidade dos microrganismos aos estímulos

ambientais, induzindo mudanças na expressão gênica e no acúmulo diferencial de proteínas. Desse modo é compreensível que esta via metabólica tenha se destacado em todas as fitofisionomias estudadas.

Família OmpR

A TCS é uma rota extensa e complexa subdividida em várias famílias, dentre elas a família OmpR (figura 10), que compreende reguladores de resposta amplamente difundidos e funcionalmente diversos. Estes estão envolvidos no controle de tolerância ao estresse ambiental (como a resposta ao estresse oxidativo, osmótico e ácido), motilidade, virulência, biogênese da membrana externa e outros processos (ITOU; TANAKA, 2001). A maioria das proteínas da família OmpR são reguladores mestres que podem atuar como ativadores e repressores. A afinidade de ligação ao DNA das proteínas da família OmpR depende da fosforilação de um resíduo de aspartato no domínio receptor que estabiliza a conformação ativa do receptor de DNA no regulador (BARBIERI et al., 2010; NOVICHKOV et al., 2013).

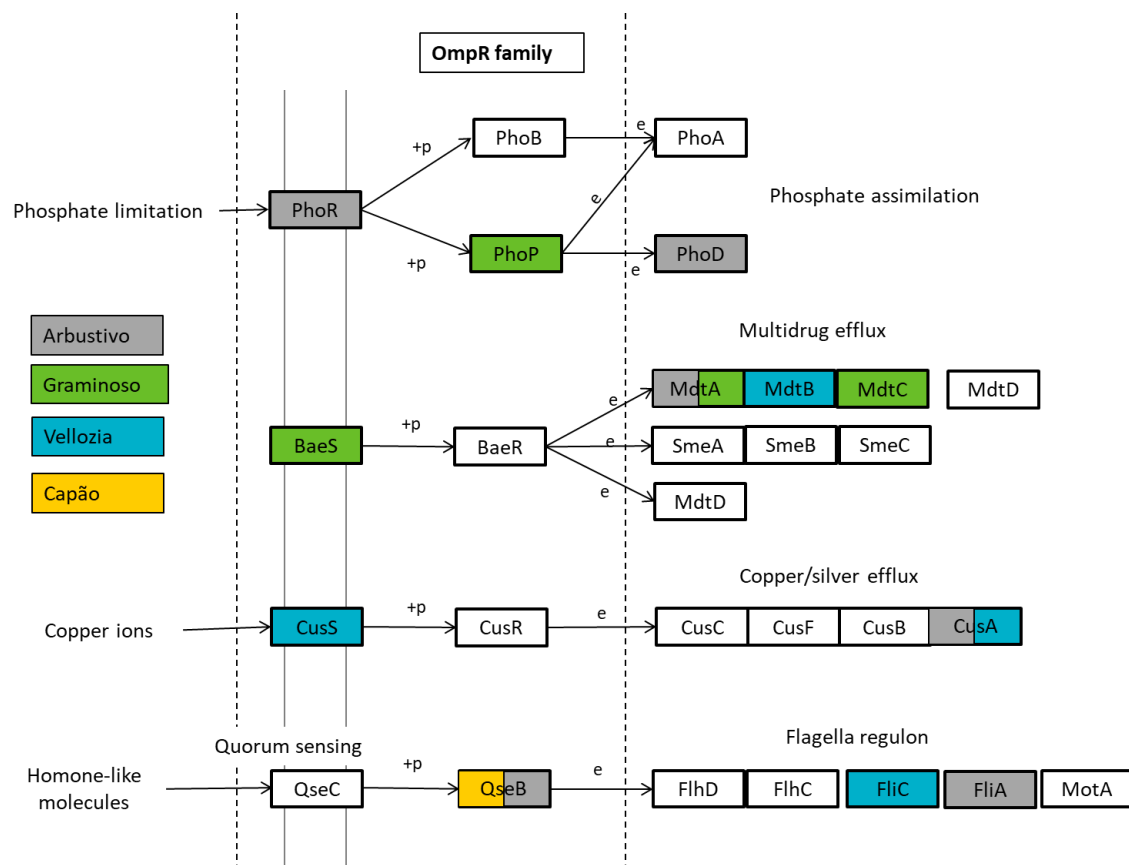


Figura 10 – Ilustração esquemática da rota metabólica two-component system. Representando uma parte da família OmpR, ilustrando os genes encontrados nas amostras, identificando as fitofisionomias.

Nas amostras analisadas foi possível detectar proteínas pertencentes a família OmpR, onde diversas reações acontecem com funcionalidades distintas, principalmente relacionadas a insuficiência de nutrientes, resistência a substâncias tóxicas e motilidade.

Para muitas bactérias a resposta de limitação de fosfato é regulada por TCS como PhoP-PhoR (PRÁGAI et al., 2004; ALVAREZ-MARTIN et al., 2012). O P é um macronutriente essencial para todos os organismos vivos, uma vez que ele é um importante componente de biomoléculas e um elemento fundamental nos processos regulatórios celulares (ALVAREZ-MARTIN et al., 2012). A fonte de P mais comumente assimilada é o fosfato inorgânico (Pi), e este é pouco acessível na natureza. Devido seu papel crucial no metabolismo celular e sua escassez em ambientes naturais, as bactérias desenvolveram mecanismos para detectar as concentrações de Pi e regular o metabolismo do P de acordo com suas necessidades (ROMANO et al., 2015). Para muitas bactérias, foi demonstrado que o mecanismo pelo qual o Pi é retirado do ambiente dependerá da concentração de Pi extracelular (HULETT, 1996). Outras fontes de fosfato inorgânico são geradas através de fosfatases alcalinas (PhoA e PhoB), fosfodiesterases (PhoD) e glicerofosfodiesterases (GlpQ) que utilizam de fontes orgânicas. PhoD é secretado pela via transportadora de duas-argininas, alguns componentes dos quais são codificados por membros do regulon Pho (EDER et al., 1996; PRÁGAI et al., 2004). O regulador de resposta PhoP é ativado por seu sensor cognato-quinase PhoR. Quando fosforilado PhoP (PhoP~P) induz a expressão do operon *phoPR* cerca de três vezes mais a partir de um baixo nível constitutivo de expressão e é necessário para a indução ou repressão de outros membros do regulon Pho (HULETT et al., 1994; PRÁGAI; HARWOOD, 2002). Um trabalho realizado por Mitre (2018) e colaboradores, nas áreas de canga da Serra dos Carajás, indica que tais solos possuem escassez de fósforo, com exceção das áreas de Capão Florestal onde há maior concentração de P. Nas amostras examinadas foi possível detectar nas fitofisnomias de Campo Graminoso e Arbustivo, o sistema PhoRP resultando PhoD, exemplificando desse modo, a maquinaria molecular desenvolvida pelos microrganismos para sobreviverem sob difíceis condições como a baixa disponibilidade de fósforo.

Detectaram-se também nos Campos Graminoso, *Vellozia* e Arbustivo, proteínas envolvidas em reações de multirresistência a drogas. Em bactérias, a resistência a substâncias tóxicas está frequentemente associada aos transportadores de *multidrug efflux*. Estes são um grupo grande e diversificado de proteínas capazes de proteger as células contra uma ampla

variedade de toxinas ambientais por extrusão ativa de compostos nocivos (BARANOVA; NIKAIDO, 2002). O TCS BaeSR está relacionado com o aumento da resistência a metais e drogas múltiplas na indução de sistemas de efluxo de drogas (NISHINO; NIKAIDO; YAMAGUCHI, 2007). O regulon confirmado de BaeR consiste no gene *acrD*, no gene *spy* e no operon *mdtABCD-baeSR*. Esses genes codificam duas bombas de efluxo de *multidrug* RND (resistência, nodulação e divisão celular), MdtABC e AcrD; uma bomba de efluxo de *multidrug* predita MFS (superfamília de facilitadores principais), MdtD; as proteínas BaeS e BaeR; e a proteína periplasmática *spy* (REQUENA, 2012). Estas reações estão relacionadas com a capacidade dos agentes patogênicos bacterianos de suportar doses letais de toxinas estruturalmente diversas, capazes de erradicar cepas não resistentes (SUN; DENG; YAN, 2014). Os solos de canga possuem significativas concentrações de metais pesados (SILVA, 1992), portanto é coerente a presença de *multidrug efflux*.

O controle regulatório das concentrações de metais em organismos vivos é vital para prevenir danos celulares. Nos Campos de *Vellozia* e Arbustivo, devido à natureza tóxica dos metais, as bactérias desenvolveram mecanismos sofisticados que conferem resistência à prata e cobre (GRASS; RENSING, 2001; GUDIPATY et al., 2012). O TCS CusR/CusS induz expressão gênica envolvida no efluxo de metais sob condições de elevadas concentrações de Cu(I) e Ag(I), protegendo desse modo as células (XIAO et al., 2017). Foram identificadas nas áreas dos Campos Arbustivo, *Vellozia* e Capão Florestal, proteínas do sistema de *quorum sensing* QseC-QseB. O qual faz parte da regulação positiva de genes de flagela e motilidade por ativação da transcrição de *flhDC*, um operon que codifica o regulador mestre desses genes (SHARMA; CASEY, 2014). Em ambientes pobres nutricionalmente e que possuem compostos tóxicos, os microrganismos necessitam então se locomover de modo mais eficiente, nesse caso a motilidade proporciona uma vantagem primordial (OSTERMAN et al., 2015).

Família NarL

Outra família que se destacou dentre as análises foi a NarL (figura 11) envolvida na detecção de nitrato e nitrito, presente nas fitofisionomias que compõem os Campos Rupestres. Nesse sistema ocorre algo peculiar, pois contém dois membros transmissores-sensores, NarX e NarQ, e dois reguladores de resposta, NarL e NarP. A recepção do sinal de nitrito ou nitrato por NarX ou NarQ provoca uma transferência de mensagem para NarL e NarP na forma de

LiaSR constitui um TCS e é um dos vários sistemas que coordenam a resposta genética aos antibióticos de parede celular (MASCHER et al., 2004). Amplamente encontrado em bactérias gram-positivas com baixo conteúdo de G+C, é conhecido por regular múltiplos alvos que determinam a virulência, a tolerância ao estresse e a persistência nessas bactérias (SUNTHARALINGAM et al., 2009; SHANKAR et al., 2015). O sistema LiaSR é codificado como parte do operon *liaIHGFSR*; a deleção de vários genes operon conduziu ao aumento da sensibilidade aos antibióticos que visam a parede celular (JORDAN et al., 2006). O regulador de resposta LiaR está envolvido na resposta a agentes antimicrobianos de parede celular, incluindo antibióticos e peptídeos antimicrobianos, e pode regular resposta a esses agentes por expressão de genes envolvidos na síntese da parede celular, assim como genes envolvidos na modificação da membrana celular e formação de pili (KLINZING et al., 2013). Os solos de canga possuem baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente de N (MITRE et al., 2018), havendo desse modo uma acirrada competição interespecífica entre os microrganismos em busca de sobrevivência. Para tal, estes desenvolvem mecanismos de propriedades antimicrobianas, como antibióticos, com o intuito de eliminar demais organismos (TYC et al., 2017).

Nos Campos de *Vellozia* e Graminoso notaram-se proteínas relacionadas à hipóxia. O TCS DevR-DevS exerce papel fundamental na adaptação a hipóxia e condições de elevado óxido nítrico (NO) (LEE et al., 2008). Esses achados são de importância crucial, pois acredita-se que os sinais ambientais de hipóxia e óxido nítrico possam contribuir para a latência in vivo (SAINI; TYAGI, 2005). O regulon de dormência DevR é um programa de transcrição induzido por baixa tensão de oxigênio, óxido nítrico, monóxido de carbono que permite adaptação bacteriana e sobrevivência durante períodos de persistência não replicante em modelos in vitro de dormência (KAUR et al., 2014). Os Campos Graminosos são áreas que permanecem alagadas durante boa parte do ano (SKIRYCZ et al., 2014; SCHAEFER et al., 2016), o que gera baixas condições de O₂, desencadeando em mecanismos de sobrevivência desenvolvidos pelos microrganismos como respostas de estresse.

Presente nos Campos de *Vellozia* e Graminoso, o sistema regulatório NreB-NreC, estimula a expressão de genes da respiração do nitrato sob condições anaeróbicas. Os alvos do NreB-NreC são os genes da redutase do nitrato (*narGHJI*), da nitrito redutase (*nirRBD* e *sirAB*) e do transportador do nitrato NarT (FEDTKE et al., 2002; SCHLAG et al., 2008; REINHART et al., 2010). NreB é um sensor citoplasmático de histidina quinase usando um

domínio PAS com um cofator [4Fe-4S] $2\leq$ para detecção de O₂ (KAMPS et al., 2004; MÜLLNER et al., 2008). O NreC fosforilado liga-se ao DNA e estimula a expressão de narG e outros genes-alvo; sob condições anaeróbicas, a presença de nitrato estimula ainda mais a expressão de narG (NILKENS et al., 2014).

Nota-se então que as proteínas identificadas na família NarL estão em grande maioria relacionadas com o metabolismo do N, principalmente em condições de baixa concentração de oxigênio. Isto pode indicar que solos das áreas dos Campos de *Vellozia* e Graminoso tais condições prevalecem, fazendo com que os microrganismos desenvolvam técnicas de sobrevivência e de assimilação dos nutrientes necessários, os quais estão escassos, aumentando assim a competição dentre os microrganismos. A ausência de detecção de proteínas nas amostras de Capão Florestal, pode se dar devido este ambiente possuir teores maiores de nutrientes (MITRE et al., 2018), solos um pouco mais profundos, facilitando a drenagem e absorção de água (SCHAEFER et al., 2016), condições mais favoráveis aos microrganismos.

Em ambientes com baixos níveis de N, sistemas altamente regulados são desenvolvidos pelos microrganismos para detecção, aquisição e utilização de nitrogênio como, por exemplo, as proteínas PII GlnB e GlnK (SCHUMACHER et al., 2015), as proteínas do TCS NtrB e NtrC (também conhecidos como GlnL e GlnG respectivamente) e a enzima bifuncional GlnD (remoção de uridililtransferase / uridilo) (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). O GlnD detecta o status de nitrogênio da célula através do nível de glutamina no ambiente externo e transmite essa informação para GlnB e GlnK, catalisando uma modificação covalente dessas proteínas (BONATTO et al., 2007).

Família NtrC

Na família NtrC (figura 12) também encontra-se outro sistema, NtrY-NtrX, associado à regulação do metabolismo de nitrogênio. As proteínas NtrY e NtrX compartilham similaridade com NtrB e NtrC e podem ter se originado de uma duplicação e diferenciação dos genes ntrBC (CAPRA et al., 2012; BONATO et al., 2016). O sistema NtrY-NtrX é necessário para assimilar diferentes fontes de nitrogênio em algumas espécies como, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, *Rhodobacter capsulatus*, *Ehrlichia chaffeensis*, e *Herbaspirillum seropedicae*, (ISHIDA et al., 2002;

NOGALES et al., 2002; DREPPER et al., 2006; CHENG; LIN; RIKIHISA, 2014; BONATO et al., 2016).

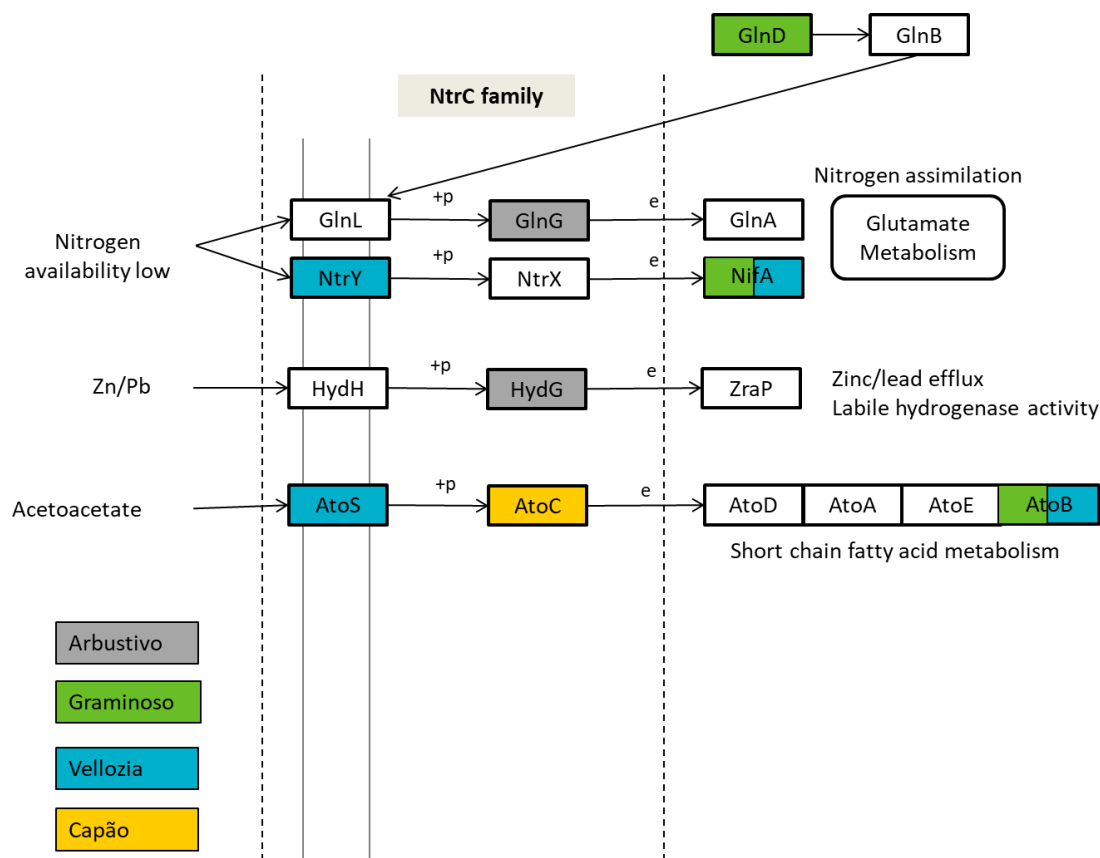


Figura 12 – Ilustração esquemática da rota metabólica *two-component system*. Representando uma parte da família NtrC, ilustrando os genes encontrados nas amostras, identificando as fitofisionomias.

Este mesmo sistema pode desenvolver outras funções em outras espécies como em *Brucella spp.*, onde atua como um sensor redox que influencia a replicação bacteriana em células eucarióticas (CARRICA et al., 2012). Também em *Brucella spp.* assim como em *Neisseria gonorrhoeae*, o sistema regula a expressão de enzimas respiratórias, incluindo enzimas de respiração de N (desnitrificação) e citocromo oxidases de alta afinidade (CARRICA et al., 2012; ATTACK et al., 2013). Na bactéria fotossintética *R. capsulatus*, o sistema NtrY / NtrX também regula a formação de complexos fotossintéticos (GREGOR et al., 2007).

Verificou-se também que no Campo Arbustivo há resposta ao estresse causado pela presença de Zinco, elemento este que já havia sido anteriormente relatado nos solos de canga (SILVA, 1992). O TCS HydH/G, responde a altas concentrações de Zn^{2+} no meio e regula a expressão do gene *zraP*, o qual codifica para uma proteína periplasmática envolvida na

tolerância ao zinco (LEONHARTSBERGER et al., 2001). O AtoC é conhecido por regular positivamente a expressão de genes do operon *atoDAEB*, codificando enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta (PAULI; OVERATH, 1972; JENKINS; NUNN, 1987), após a indução de acetoacetato (LIOLIOU et al., 2005; GRIGOROUDIS et al., 2007). AtoC é um membro da família NtrC-NifA de ativadores de transcrição polimerase σ^{54} -RNA (PORTER; NORTH; KUSTU, 1995), este funciona como um regulador transcricional e pós-traducional (LIOLIOU; KYRIAKIDIS, 2004), corroborando com a assimilação do N.

A família NtrC também é relacionada a assimilação de Nitrogênio, principalmente em condições adversas com baixas concentrações de tal nutriente, havendo a identificação de proteínas pertencentes primordialmente as fitofisionomias de *Vellozia*, Gramíneo e Arbustivo. Capão Florestal mais uma vez pouco se sobressai, como já discutido, crê-se que devido as suas características mais favoráveis a estabilidade da microfauna.

Quimiotaxia

A quimiotaxia é a motilidade dirigida por meio da qual os microrganismos percebem sinais químicos e se mudam para ambientes mais favoráveis. Foram encontradas proteínas relacionadas à quimiotaxia bacteriana em todas as fitofisionomias (figura 13). *Methyl-accepting chemotaxis proteins* (MCPs) são os receptores mais comuns em bactérias e archaea (SALAH UD-DIN; ROUJEINIKOVA, 2017), consistindo em histidina quinase CheA, proteína de acoplamento de receptor CheW, metiltransferase CheR e metilesterase CheB (WADHAMS; ARMITAGE, 2004; BI; LAI, 2015). O regulador de resposta CheB modula a saída de sinalização dos receptores de quimiotaxia através do controle do nível de metilação de quimiorreceptores (DJORDJEVIC; STOCK, 1998). A montagem dos MCPs, CheA e CheW em arranjos ordenados aumenta sua concentração local e permite uma cooperatividade positiva, aumentando assim a sensibilidade dos receptores e a velocidade da resposta. A metilação/demetilação dos resíduos de glutamato no subdomínio por CheR e CheB, respectivamente, serve como mecanismo de adaptação sensorial em muitas bactérias (ENDRES; WINGREEN, 2006; BI; LAI, 2015). Através desse sistema quimio-sensorial as bactérias se movem de modo a rastrear gradientes de substâncias químicas em seu ambiente, evitando-os e locomovendo-se em direção a fontes atraentes, como aminoácidos, distanciando-se de repelentes potencialmente prejudiciais (FRANK et al., 2016). Tais

mecanismos tornam-se imprescindíveis em ambientes como os solos de canga, auxiliando na sobrevivência dos microrganismos.

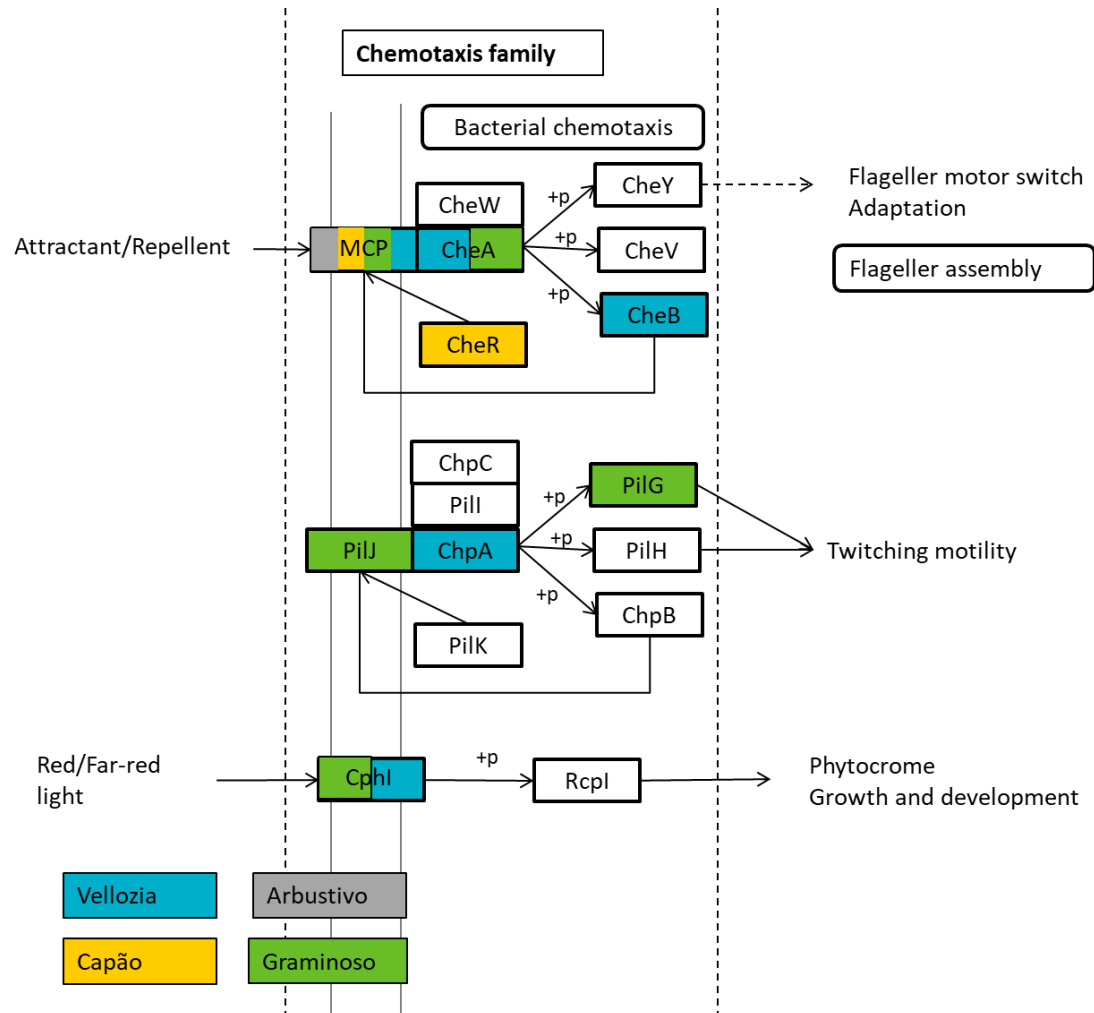


Figura 13 – Ilustração esquemática da rota metabólica *two-component system*. Representando uma parte da família de Quimiotaxia, ilustrando os genes encontrados nas amostras, identificando as fitofisionomias.

Outra forma de motilidade bacteriana é a contração muscular, a qual funciona pela extensão, fixação e retração do pili polar do tipo IV e é importante na colonização de superfícies hospedeiras e na produção de biofilmes (MATTICK, 2002). O sistema quimio-sensorial Pil-Chp é homólogo ao sistema Che. As proteínas que compreendem o sistema Pil-Chp são codificadas pelo operon pil-chp. Como nos sistemas flagelares, há um quimiorreceptor transmembranar (PilJ), uma histidina quinase CheA (ChpA) e proteínas de adaptação (ChpB e PilK). O operon contém dois genes que codificam os reguladores de

resposta do tipo CheY (PilG e PilH) e dois genes que codificam as proteínas do tipo CheW (PilI e ChpC), ambos presentes em uma cópia no paradigma de quimiotaxia de *E. coli* (SILVERSMITH et al., 2016).

Motilidade não é apenas uma maneira pela qual as bactérias se movem de um local para outro, é também a primeira fase do desenvolvimento do biofilme, o qual inicia-se com fixação reversível, seguida de fixação, maturação e dispersão irreversíveis (SAUER et al., 2002; PRÜSS, 2017). Um biofilme confere grandes vantagens aos microrganismos aderentes, proporcionando um ambiente apropriado para o crescimento e sobrevivência (DUNNE, 2002; COS et al., 2010), protegendo-os contra influências externas prejudiciais. Em ambientes como os solos de canga, os quais estão sob condições severas como exposição a raios ultravioletas, altas temperaturas diárias, baixa retenção de água e baixa disponibilidade de nutrientes (JACOBI et al., 2007; SKIRYCZ et al., 2014), o desenvolvimento de tais ferramentas faz-se, portanto, imprescindível.

O fitocromo cianobacteriano CphI é uma histidina quinase regulada pela luz que intervém a fosforilação reversível vermelha, vermelho-distante de um regulador de resposta pequeno, Rcpl, codificado pelo gene adjacente, implicando assim a fosforilação-desfosforilação da proteína na etapa inicial de transdução de sinal de luz por fitocromo (YEH et al., 1997). Para organismos fotossintéticos, a luz é uma fonte necessária de energia de radiação que é convertida em energia química para processos celulares, e para organismos não fotossintéticos, a luz pode agir como uma sugestão para otimizar o posicionamento e a orientação espacial (AULDRIDGE; FOREST, 2011). Desse modo, fica claro a importância de se desenvolverem estratégias fotossensíveis como mecanismos de sobrevivência nos solos de canga, auxiliando na persistência dos microrganismos que as desempenham.

Como discutido, os TCS são em sua maioria respostas a situações de estresse, sendo estes desencadeados por baixa disponibilidade de nutrientes, presença de metais pesados, hipóxia, resultando em mecanismos de defesa e de sobrevivência como competição interespecífica, produção de antibióticos, motilidade e formação de biofilmes. Caracterizando respostas rápidas, altamente reguladas as constantes mudanças que ocorrem nos ambientes de canga.

5.6 ABC transporter e Quorum Sensing

A segunda via de maior destaque é chamada de *ATP-binding cassette transporters* (ABC). Estes compõem uma das maiores famílias de complexos proteicos que têm funções fisiológicas importantes em todos os organismos vivos (BROEHAN et al., 2013). Utilizam a ligação e a hidrólise do ATP para impulsionar o transporte de uma variada gama de substratos através das membranas lipídicas (REES; JOHNSON; LEWINSON, 2009). Diferentes proteínas (importadores e exportadores) são codificadas a partir dessa família de genes, translocando diversos substratos, como açúcares, aminoácidos, íons, peptídeos, proteínas, colesterol, metabólitos e toxinas através de membranas extra e intracelulares (LINTON, 2007; BENADIBA; MAOR, 2016; EL-AWADY et al., 2016). Esta família está presente em ambos, procariontes e eucariontes, e exercem múltiplas funções. Nos procariotos, eles representam tanto as proteínas de influxo, que transportam nutrientes para as células, quanto as proteínas de efluxo, que expõem toxinas e drogas para fora da célula. No entanto, em eucariotos, eles são apenas expressos como proteínas transportadoras de efluxo protegendo a célula de toxinas (HIGGINS, 2001; BREIER et al., 2013; EL-AWADY et al., 2016). Os *ABC transporters* são vinculados a uma variada gama de fenômenos biológicos essenciais, não se restringindo apenas ao transporte transmembranar. Processos como absorção de nutrientes, exportação de toxinas, divisão celular, nodulação bacteriana plantas e reparo de DNA mostraram-se ligadas a energia de hidrólise do ATP (DAVIDSON et al., 2008).

Alguns metais como sódio, magnésio e potássio fazem parte do metabolismo básico das células, sendo, portanto, essenciais para a vida. Os metais ferro, zinco, níquel, cobre, manganês, cobalto e molibdênio também estão envolvidos em processos celulares e estão presentes em concentrações mM ou μ M (HELDAL; NORLAND; TUMYR, 1985). Entretanto, a maioria dos demais metais, incluindo o chumbo, o mercúrio, o alumínio e a prata, não têm absolutamente nenhuma função biológica e são, portanto, denominados elementos abióticos. Bactérias têm mecanismos para se protegerem desses metais (NIES, 2003). Porém, mesmo os metais que fazem parte de processos celulares, quando em altas concentrações podem se tornar tóxicos e prejudiciais à célula (SCHALK; HANNAUER; BRAUD, 2011). Foram encontrados 33, 19, 23 e 14 enzimas na via metabólica dos *ABC transportes* nas fitofisionomias de *Vellozia*, Arbustivo, Graminoso e Capão, respectivamente. Em ambientes como os solos de canga, onde há presença de diversos metais (SILVA, 1992), os *ABC transporters* desempenham papel crucial na regulação das concentrações que serão

absorvidas pelas células. Desse modo eles podem auxiliar os organismos a se protegerem de substâncias nocivas.

O *quorum sensing* (QS) é um processo de comunicação célula-célula que permite que as bactérias modifiquem coletivamente o comportamento em resposta a mudanças na densidade celular e na composição de espécies da comunidade microbiana circundante (PAPENFORT; BASSLER, 2016a). O QS desafia a noção tradicional de bactérias como agentes autônomas, permitindo-lhes funcionar como grupos multicelulares e prosperar em nichos ambientais específicos (PRANEENARARAT; PALMER; BLACKWELL, 2012). De acordo com Galloway et al., (2011) o QS é mediado por pequenas moléculas difusíveis, denominadas auto-indutores, que são sintetizadas intracelularmente (através do crescimento das bactérias) e liberadas no meio; à medida que o número de células em uma colônia bacteriana aumenta, também aumenta a concentração extracelular do auto-indutor. O aumento da produção do sinal dos auto-indutor, uma vez atingido o *quorum*, aumenta a sensibilidade do processo de sinalização (isto é, a autoindução) e facilita a sincronização em toda a população do fenótipo regulado por QS. (PRANEENARARAT; PALMER; BLACKWELL, 2012). Assim, o QS permite que as células dentro de uma colônia bacteriana atuem cooperativamente, facilitando o comportamento adaptativo dependente da população (GALLOWAY et al., 2011). Alterações metabólicas e comportamentais associadas ao QS permitem coordenação funcional geralmente favorável às bactérias quando em alta abundância, como, bioluminescência, virulência, produção de enzimas extracelulares e a formação de biofilme (CAMILLI; BASSLER, 2006; DECHO; NORMAN; VISSCHER, 2010; PAPENFORT; BASSLER, 2016b).

As condições ambientais físico-químicas modelam a composição microbiana presente no solo, como também o metabolismo microbiano pode alterar as características físicas e geoquímicas do ambiente: por exemplo, o pH pode aumentar através da remoção de substratos ácidos e/ou produção de produtos metabólicos alcalinos (DECHO; NORMAN; VISSCHER, 2010). Organismos extremófilos são conhecidos por sua capacidade de sobreviver e se adaptar as condições ambientais “extremas”. Isso inclui altos e baixos níveis de pH, extremos de calor e frio, níveis de alta pressão, salinidade (alta e baixa), limitações de nutrientes ou combinações dos anteriores (MONTGOMERY et al., 2013). Os solos de canga possuem tais características (JACOBI et al., 2007; SKIRYCZ et al., 2014), exigindo, portanto, plasticidade metabólica dos microrganismos para que estes sejam capazes de se adaptar

rapidamente as mudanças de tal ambiente. Através do QS há uma constante comunicação entre as comunidades microbianas e o ambiente circundante, onde estas reconhecem as condições e alterações que estão sendo submetidas, se comunicam entre si, desenvolvendo estratégias de sobrevivência.

5.7 Metabolismo dos Nutrientes

Seis elementos principais - H, C, N, O, S e P - constituem os principais blocos de construção de todas as macromoléculas biológicas (SCHLESINGER; BERNHARDT, 2013). As comunidades microbianas do solo desempenham um papel integral no metabolismo dos nutrientes, como o C, N e S para a aquisição de energia (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008). Portanto a detecção de vias metabólicas (figura 14) desses nutrientes nos solos de canga é importante e nos mostra um pouco da ciclagem desses elementos nesses ambientes.

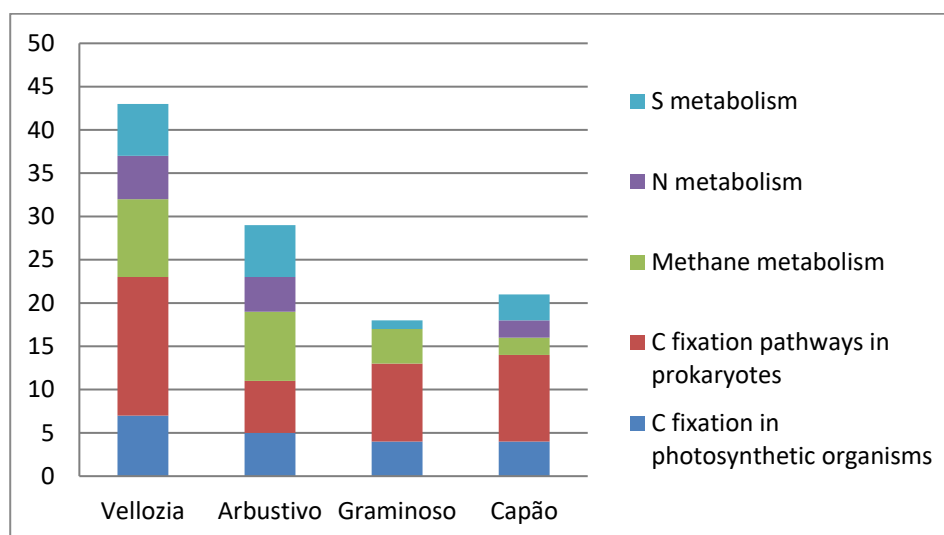


Figura 14 – Quantidade de enzimas presentes nas vias metabólicas dos metabolismos dos seguintes nutrientes: Enxofre (S), Nitrogênio (N) e Carbono (C), em cada fitofisionomia.

A ciclagem de nutrientes é a base para muitos processos no solo, como a manutenção da fertilidade do solo, por meio da qual, elementos químicos essenciais à produção e funcionamento de organismos vivos são movidos e reagidos quimicamente através das partes bióticas e abióticas do solo (BRUSSAARD; DE RUITER; BROWN, 2007; ZHANG et al., 2007; JÓNSSON; DAVÍÐSDÓTTIR; NIKOLAIDIS, 2017). Os ciclos biogeoquímicos de C, N e P estão interligados por produção primária, respiração e decomposição em ecossistemas terrestres (FINZI et al., 2011). A detecção das vias metabólicas relacionadas ao metabolismo

desses nutrientes nos ambientes de canga é de suma importância, pois nos mostra que mesmo submetidos a condições de difícil estabilidade, os microrganismos desenvolvem mecanismos para realizar a ciclagem de tais elementos. É notável uma maior diversidade de tais vias nos Campos de *Vellozia*.

Carbono

O carbono (C) é a base química de toda a vida como se conhece, e desempenha o papel de principal bloco de construção de todos os organismos vivos na Terra, sendo o principal portador de energia para processos metabólicos (JANSA; TRESEDER, 2017). Como matéria orgânica, o C altera as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos; é um indicador primário da qualidade do solo (RICE, 2005). De acordo com Milne et al., (2015), o C ajuda a manter a estrutura do solo, formando agregados maiores e estáveis, que armazenam água em poros agregados criando maior permeabilidade, aeração e drenagem do solo, além de fornecer substrato e energia para apoiar a atividade microbiana, fornece um reservatório de N orgânico, P e outros nutrientes para a produtividade de plantas. Analisando a rota metabólica de fixação de Carbono em procariotos (figura 15) foram detectadas 19 enzimas, sendo estas pertencentes a todos os seis principais grupos enzimáticos e foram identificadas enzimas nas amostras de todas as fitofisionomias.

Aconitases (EC 4.2.1.3) são proteínas ferro-enzofre que catalisam a isomerização reversível de citrato e isocitrato via cis-acônito (KENNEDY; ANTHOLINE; BEINERT, 2007). Enquanto que na mitocôndria a aconitase faz parte do ciclo do ácido cítrico, no citosol a aconitase é um fator trans-regulador que controla a homeostase do ferro em um nível pós-transcricional (TRUJILLO et al., 2010). A piruvato fosfato diquinase (EC 2.7.9.1) é uma enzima vital no metabolismo energético celular, pois catalisa a formação de fosfoenolpiruvato dependente de ATP e Pi a partir do piruvato em plantas C4, porém a reação inversa forma ATP em bactérias e protozoários (MINGES et al., 2017). Piruvato: oxirredutase ferredoxina (EC 1.2.7.1) é uma enzima microbiana que utiliza pirofosfato de tiamina, três agregados [4Fe-4S] e coenzima A na oxidação reversível do piruvato para gerar acetil-CoA e dióxido de carbono (CHEN et al., 2018). Acetil-CoA carboxilase (ACCase) foi detectada em todas as fitofisionomias, esta enzima carboxila acetil-CoA em malonil-CoA e, portanto, representa o primeiro passo comprometido na biossíntese de ácidos graxos (GERUSZ, 2010).

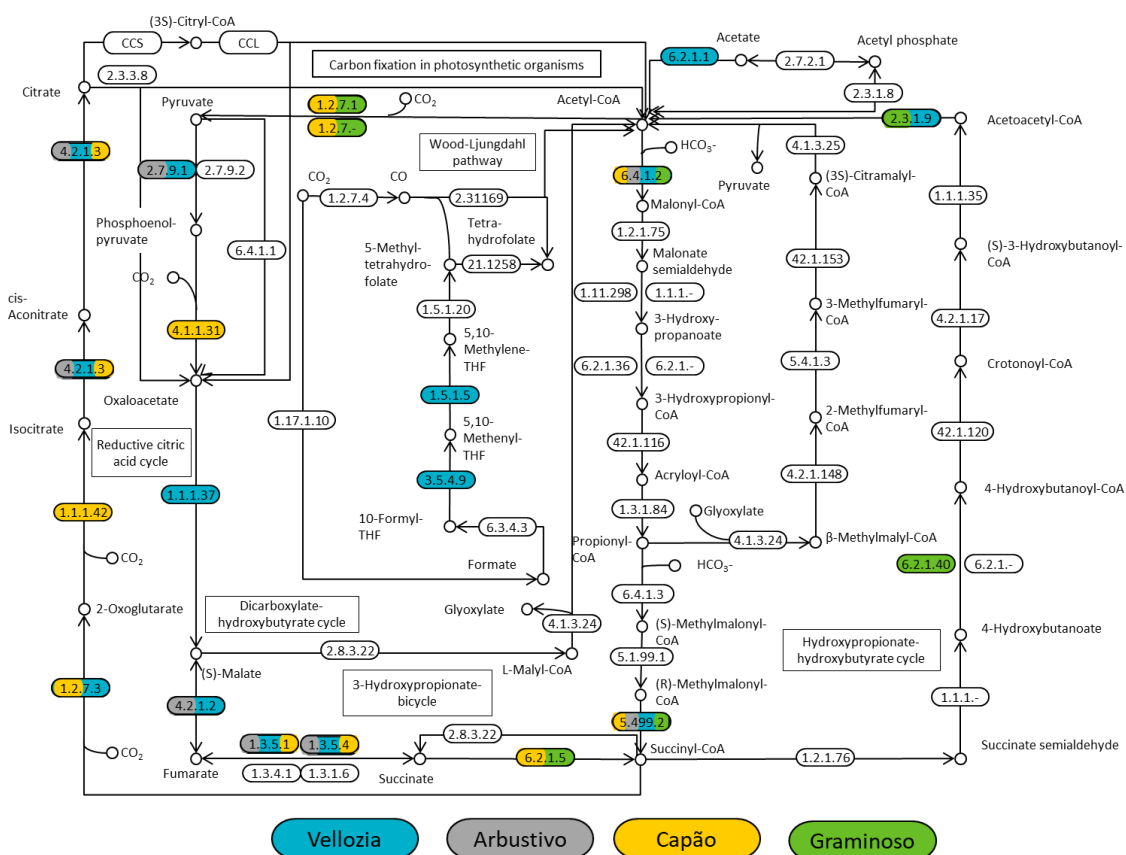


Figura15 – Rota metabólica da fixação de Carbono em procariotos, identificando as enzimas e em quais fitofisionomias foram detectadas.

O ACCase é um multímero essencial para o crescimento celular cujos componentes são altamente conservados entre as bactérias, tornando-se um alvo promissor de amplo espectro (CRONAN; WALDROP, 2002). A metilmalonil-CoA-mutase (EC 5.4.99.2) catalisa a conversão de L-metilmalonil-CoA em succinil-CoA, ligando assim as vias catabólicas finais de aminoácidos de cadeia ramificada, ácidos graxos de cadeia ímpar e colesterol ao ciclo de Krebs (FOWLER; LEONARD; BAUMGARTNER, 2008). O metabolismo do carbono foi o que obteve o maior número de enzimas identificadas, incluindo também: malato desidrogenase, fumarato hidratase, tioquinase succínica, dentre outras.

Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um elemento essencial nos sistemas biológico, sua disponibilidade têm o potencial de estruturar comunidades microbianas, bem como controlar a produtividade na escala do ecossistema. Além disso, sua versátil química redox é a base de complexas transformações biogeoquímicas que controlam o inventário de N fixo (biologicamente disponível) em ambientes locais, em escala global e ao longo do tempo geológico (JETTEN, 2008). O N é responsável pelo crescimento das plantas, atua diretamente na fotossíntese, é parte constituinte da clorofila, vitaminas, carboidratos e proteínas, e atua no desenvolvimento do sistema radicular.

Dentre as 9 enzimas identificadas no metabolismo do Nitrogênio (figura 16), é perceptível uma predominância de enzimas pertencentes ao grupo das Oxidoreductases. Importantes enzimas foram detectadas como nitrato redutase (EC 1.7.5.1), a qual é uma enzima chave para a aquisição de nitrogênio por plantas, algas, leveduras e fungos, é a primeira enzima para assimilação de nitrato, é uma proteína multi-redox capaz de mediar a doação de elétrons de NAD (P) H a receptores artificiais e proteínas redox (CHAMIZO-AMPUDIA et al., 2017), esta foi assim detectada no Campo de *Vellozia*. Outra enzima essencial encontrada nas áreas de Capão Florestal foi a nitrogenase (EC 1.18.6.1), a qual é um sistema enzimático multicomponente que desempenha um papel crítico na fixação biológica de nitrogênio, a temperaturas e pressões ambientes, utilizando um aglomerado incomum de Fe-S no local ativo, contendo Mo e Fe, ou V e Fe, ou Fe apenas (HU; RIBBE, 2016; DJURDJEVIC; EINSLE; DECAMPS, 2017).

Nos Campos Arbustivos foi identificada a nitrito redutase (EC1.7.2.2). Esta é uma enzima solúvel no periplasma, contendo centros de hemograma do tipo c e d1 (portanto, geralmente chamado de citocromo cd1) e pode receber elétrons da citocina bc1 via citocromo c550 ou uma proteína de cobre conhecida como pseudoazurina (NICHOLLS et al., 2013). A enzima citocromo c nitrito redutase catalisa a redução do nitrito a amônia e pode ser considerada uma das principais etapas do ciclo biológico do N (BERKS et al., 1995), onde participa do metabolismo energético anaeróbico da ammonificação dissimilatória de nitrato (COLE; BROWN, 1980; EINSLE et al., 1999).

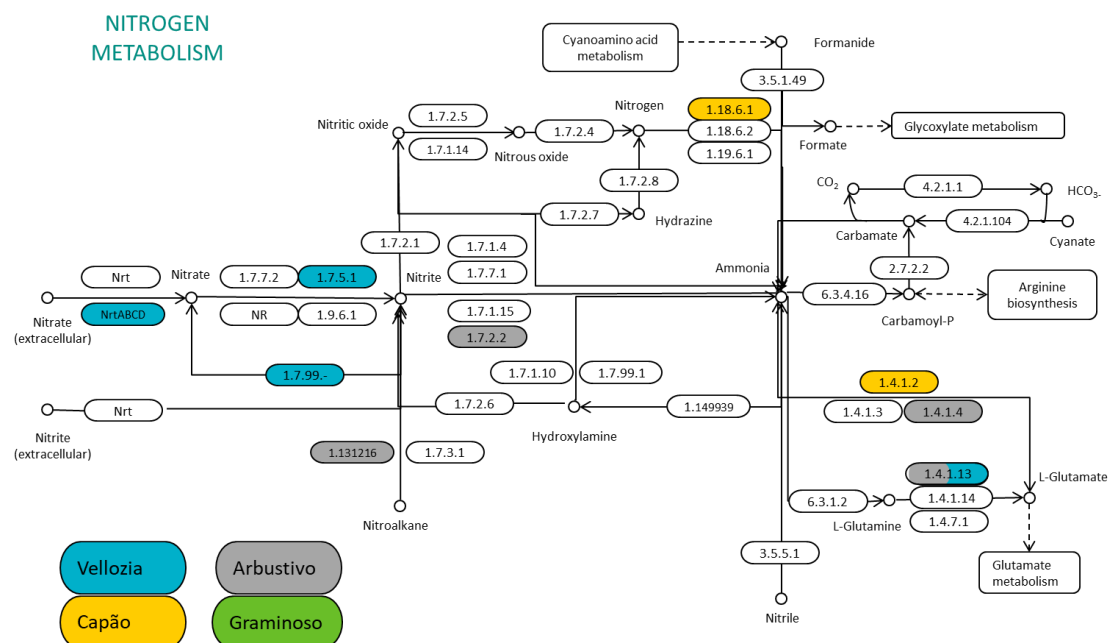


Figura16 – Rota metabólica do Nitrogênio identificando as enzimas presentes e em quais fitofisionomias foram detectadas.

Outras enzimas também foram constatadas como glutamato desidrogenase NADH (EC 1.4.1.2) e NADPH (EC 1.4.1.4), glutamato sintase (EC 1.4.1.13) e nitronato monooxygenase (EC1.13.12.16). No processo de dissimilação da redução de nitrato os operons NarGHI e NrfAH foram identificados nos Campos de *Vellozia* e Arbustivo, respectivamente. Já no processo de desnitrificação os operons NarGHI bem como NifDKH foram assim detectados nas áreas de *Vellozia* e Capão Florestal. E no processo de nitrificação o operon NxrAB foi encontrado no Campo de *Vellozia*. Proteínas envolvidas no metabolismo do N se encontram mais presente nos Campos Rupestres. Mitre et al., (2018), em seu trabalho detectaram o ciclo do N mais conservativo nos Campos de *Vellozia*. Em nossas amostras, tal área possui a mesma quantidade de enzimas identificadas que o Campo Arbustivo, sendo detectadas três em cada fitofisionomia.

Enxofre

Enxofre (S), juntamente com N e P, é responsável pela síntese de proteínas e por uma série de vitaminas e cofatores essenciais (KERTESZ; MIRLEAU, 2004). Nos solos, o S ocorre em formas inorgânicas e orgânicas e é ciclado entre estas formas através de processos de mobilização, mineralização, imobilização, oxidação e redução (WILHELM SCHERER,

Outras enzimas importantes no metabolismo do S foram encontradas nos solos de canga, como: sulfito oxidase (EC 1.8.3.1), a qual é uma enzima presente nas mitocôndrias de todos os eucariotos. Esta possui a função de oxidar sulfito a sulfato e, via citocromo c, transfere os elétrons produzidos para a cadeia de transporte de elétrons, permitindo a geração de ATP na fosforilação oxidativa (D'ERRICO et al., 2006). Rhodanese (EC 2.8.1.1) é uma enzima mitocondrial que pertence a uma superfamília de proteínas envolvida em diversos processos, incluindo desintoxicação por cianeto, formação de aglomerados de Fe/S, reações redox, bem como transporte intracelular e vias de regulação (CIPOLLONE; ASCENZI; VISCA, 2007), sendo tal enzima detectada no Campo Arbustivo. A oxidação de sulfeto no solo pode ser catalisada pela enzima sulfeto: quinona oxidoreductase (EC 1.8.5.4) (GRIESBECK; HAUSKA; SCHUETZ, 2001; CHAN; MORGAN-KISS; HANSON, 2009). Muitas bactérias fototróficas contêm genes que codificam tal enzima, e alguns modelos de oxidação de enxofre indicam que esta funciona como rota alternativa para a produção de polissulfeto (enxofre verde) ou encapsulado em proteína glóbulos de enxofre elementares (enxofre roxo) no periplasma (DAHL, 2008; FRIGAARD; BRYANT, 2008). Cisteína sintase (EC 2.5.1.47) é considerada uma enzima chave na produção do aminoácido cisteína, que é o principal precursor na via biossintética da glutathione (GSH), reduzindo o tripeptídeo essencial nas plantas e matéria orgânica, além de proteger as proteínas contra a desnaturação, que é causada pela oxidação dos grupos tiol protéicos durante as condições de estresse (AL SHOFFE, 2018), tal enzima foi identificada nos Campos de *Vellozia* e Arbustivo. Na paisagem de Capão Florestal a enzima cistationina gama-sintase (EC 2.5.1.48) foi identificada, a qual catalisa a formação de L-cistationina a partir de O-acetil-L-homoserina e L-cisteína (CLAUSEN et al., 1998). A enzima sulfito redutase (EC 1.8.1.2) NADPH foi identificada em todos os campos, esta possui a função de catalisar a redução de sulfito a sulfeto e é necessária para a síntese de L-cisteína a partir de sulfato inorgânico (WU; SIEGEL; KREDICH, 1991). Segundo Berney et al., (2014), no solo a sulfito redutase pode atuar como um aceptor de elétrons terminal alternativo em condições de hipóxia. No processo de assimilação de redução de sulfato os operons CysND e CysJI foram identificados, em *Vellozia* e em todas as quatro distintas paisagens, respectivamente.

Fósforo

O fósforo (P) é um nutriente essencial devido ao seu papel central em inúmeras vias metabólicas. O P é um componente dos fosfolipídios, RNA, DNA e dos principais cofatores de nucleotídeos necessários para a transferência de energia e catálise na célula (WHITE; METCALF, 2007). O P é essencial para toda a biota na Terra, próximo ao nitrogênio, P é o segundo principal macronutriente limitante de crescimento para as plantas, afetando a saúde das plantas e a produtividade das culturas (BERGKEMPER et al., 2016). Nos solos o P existe na forma orgânica (Po) e inorgânica (Pi), tendo como característica a baixa disponibilidade devido à lenta difusão e alta fixação nos solos. O Pi, o qual é derivado de depósitos minerais não renováveis de fosfato, é essencial para o metabolismo das plantas, entretanto, está em grande parte inacessível para as plantas, uma vez que se liga às moléculas orgânicas nas partículas do solo (ALEXOVA; MILLAR, 2013). Em solos ácidos, o P pode ser absorvido de forma dominante pelos óxidos e hidróxidos de Al / Fe, como gibbsita, hematita e goethita (PARFITT, 1989; SHEN et al., 2011). Os microrganismos são parte integrante do ciclo do P no solo e, têm o potencial de aumentar grandemente a taxa de ciclagem de Po ou Pi, isto é, solubilizando P insolúvel orgânico e ligado a minerais (JONES; OBURGER, 2011), desse modo, desempenham um papel importante na mediação da disponibilidade de P às plantas (RICHARDSON; SIMPSON, 2011).

Diversas rotas metabólicas relacionadas ao fósforo foram encontradas em todas as fitofisionomias (figura 18). Dentre elas uma que está presente em todas as áreas é a via da pentose fosfato, a qual é importante para manter a homeostase do carbono, para fornecer precursores para a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos, para fornecer moléculas redutoras para o anabolismo e para combater o estresse oxidativo (STINCONE et al., 2015). Outra rota essencial e que está presente em todas as paisagens é a fosforilação oxidativa, que é o processo pelo qual o ATP é formado à medida que elétrons são transferidos das formas reduzidas de dinucleotídeo nicotinamida adenina (NADH) e dinucleotídeo flavina adenina (FADH₂) para oxigênio molecular (O₂) por uma série de transportadores de elétrons (WRIGHT; POPE; LIU, 2009). Os glicerofosfolipídios são encontrados em maiores quantidades nas membranas de todas as células e estão presentes em quantidades muito pequenas em reservas de gordura. Além disso, os glicerofosfolipídios são uma fonte de compostos fisiologicamente ativos. Eles também participam de sistemas de sinalização celular e como âncora de proteínas nas membranas celulares (BLANCO et al., 2017).

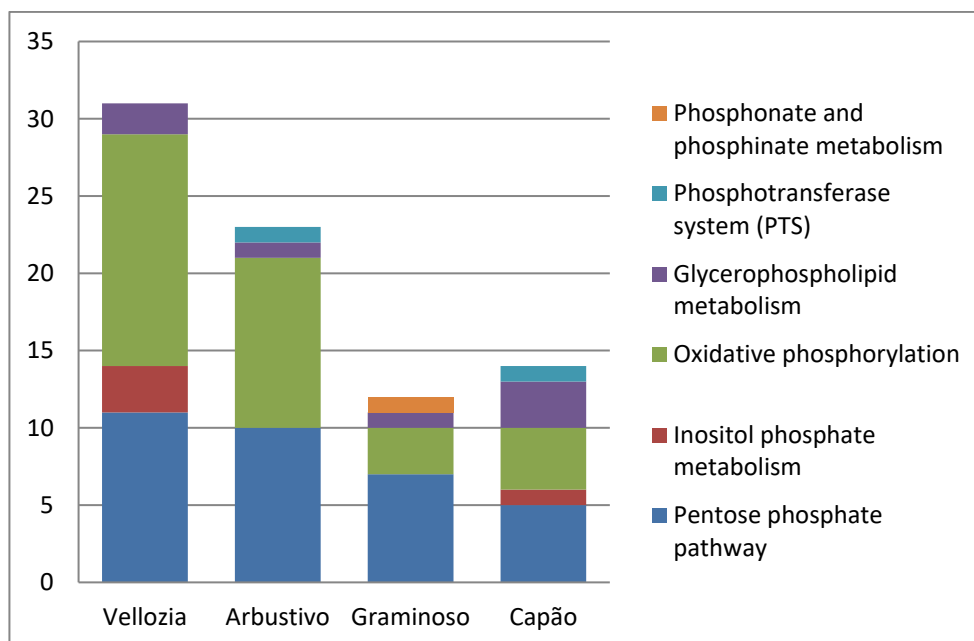


Figura 18 – Quantidade de enzimas presentes nas vias metabólicas que fazem parte do metabolismo do fósforo em cada fitofisionomia.

Nas áreas de *Vellozia* e Capão Florestal foi identificada a rota metabólica de fosfatos de inositol, as quais são moléculas de sinalização eucarióticas conservadas que implicam na regulação de muitos processos biológicos, incluindo a exportação de mRNA do núcleo, desenvolvimento embrionário, sinalização e respostas ao estresse ambiental (HATCH; ODOM; YORK, 2017). O sistema de fosfotransferase (PTS) é uma rota que foi detectada nas áreas de Capão Florestal e Campo Arbustivo. Tal via depende de fosfoenolpiruvato (PEP) e é um dos principais mecanismos utilizados pelas bactérias para a absorção de hidratos de carbono, particularmente hexoses, hexitóis e dissacarídeos, em que a fonte de energia provém da PEP (KANEHISA et al., 2018). O PTS oferece a vantagem de ligar diretamente o transporte de açúcar à sua fosforilação, reduzindo assim o custo para a introdução do açúcar na via glicolítica (STÜLKE; SCHMALISCH, 2004). Nos Campos Graminosos foram encontrados produtos naturais contendo ligações carbono-fósforo, os chamados compostos C-P, são derivados de fosfonato e fosfinato com substituição do grupo alquila por hidrogênio de ligações hidrogênio-fósforo (METCALF; VAN DER DONK, 2009).

5.8 Similaridades entre os Campos Rupestres de Arbustivo e de *Vellozia*

Ambos os Campos rupestres de *Vellozia* e Arbustivo obtiveram maior destaque nas análises feitas, tanto em diversidade proteica, filogenética e metabólica. e estes demonstraram significativa similaridade entre eles em todas essas análises.

Pôde-se observar o agrupamento entre as fitofisionomias Arbustivo e *Vellozia* nos dendrogramas baseados na filogenia (figura 4) e nas vias metabólicas (figura 9). Também notou-se significativa convergência das proteínas anotadas entre essas duas fitofisionomias (figura 3b). Segundo Schaefer et al., (2016), tais fitofisionomias são classificadas como unidades geoambientais que juntas compõem o compartimento de paisagem Campo Rupestre. Nossas análises vêm então corroborar com a similaridade presente entre tais áreas.

Comparando especificamente as rotas metabólicas (figura 19) encontradas em ambas fitofisionomias, observa-se que estas se assemelham bastante, possuindo mais de 70% de similaridade, exemplificando que estas possuem atividades funcionais moleculares muito próximas.

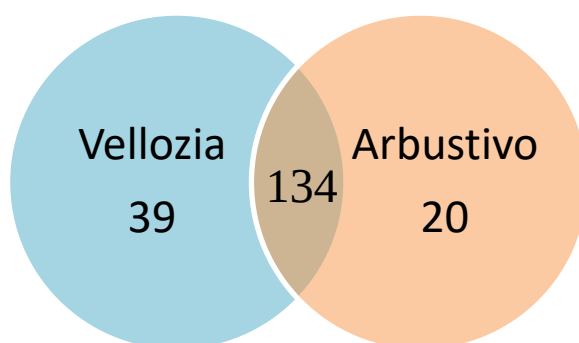


Figura 19 – Diagrama de Venn ilustrando o número de rotas metabólicas identificadas nas amostras dos Campos Rupestres Arbustivo e de *Vellozia*.

6 CONCLUSÃO

Apesar da predominância de proteínas únicas e de espécies de microrganismos exclusivos, observou-se uma alta similaridade entre as rotas metabólicas nas fitofisionomias de canga estudadas. Assim, podemos inferir que cada um desses ambientes possui um metaproteoma único, oriundo de uma composição taxonômica distinta, intimamente relacionada com a composição pedológica e florística de cada fitofisionomia. Todavia, estes microrganismos parecem exercer um grande número de funções moleculares semelhantes, demonstrando a redundância funcional da microbiota que habita os solos de diferentes fitofisionomias das cangas da Serra dos Carajás.

Foram observadas diversas proteínas vinculadas a reações de motilidade, quimiotaxia, hipóxia, baixa disponibilidade de nutrientes, produção de antibióticos, presença de metais pesados, dentre outras que configuram respostas de estresse, mecanismos de defesa, competição interespecífica e transmissão de sinais, demonstrando uma miríade de interações entre microrganismos e o ambiente de canga. Em suma, os microrganismos parecem desenvolver estratégias para sobreviver as condições severas e dinâmicas as quais estão submetidos.

Após a análise de dados pôde-se constatar que os Campos Rupestres de *Vellozia* possuem maior diversidade em todos os critérios analisados, como diversidade de proteínas, de filogenia, de enzimas envolvidas na ciclagem de nutrientes, de processos metabólicos e metabolismo de nutrientes.

Observou-se que a segunda maior diversidade de resultados dentro das análises realizadas ocorreu nos Campos Arbustivos. Concomitante a isso, notou-se uma significativa similaridade entre este ambiente e o Campo de *Vellozia*, considerando as interseções presentes nos dados de proteínas, diversidade filogenética e de vias metabólicas, essa última apresentando uma semelhança superior a 70% entre as áreas.

Por fim, embora ainda existam limitações nas técnicas disponíveis para a metaproteômica de solos, foi possível obter o proteoma das fitofisionomias estudadas. Isso permitiu derivar informações bioquímicas importantes a respeito de cada fitofisionomia, demonstrando, sobretudo o potencial da metaproteômica como ferramenta para estudo da diversidade funcional dos solos e monitoramento ambiental de áreas impactadas.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTINEZ, V.; CANO, A.; JOHNSON, J. Simultaneous determination of multiple soil enzyme activities for soil health-biogeochemical indices. **Applied Soil Ecology**, v. 126, p. 121–128, maio, 2018.
- AL SHOFFE, Y. Susceptibility and Expression of Chilling Injury. **Reference Module in Food Science**, jan., 2018.
- ALEXOVA, R.; MILLAR, A. H. Proteomics of phosphate use and deprivation in plants. **PROTEOMICS**, v. 13, n. 3–4, p. 609–623, fev., 2013.
- ALKORTA, I. et al. Soil Enzyme Activities as Biological Indicators of Soil Health. **Reviews on Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 65–73, jan., 2003.
- ALVAREZ-MARTIN, P. et al. A conserved two-component signal transduction system controls the response to phosphate starvation in *Bifidobacterium breve* UCC2003. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5258–5269, ago., 2012.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 65, n. 1, p. 80–105, mar., 2001.
- ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, maio, 2000.
- ATAK, J. M. et al. Characterization of an ntrX mutant of *Neisseria gonorrhoeae* reveals a response regulator that controls expression of respiratory enzymes in oxidase-positive proteobacteria. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 11, p. 2632–41, jun., 2013..
- AULDRIDGE, M. E.; FOREST, K. T. Bacterial phytochromes: More than meets the light. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 67–88, fev., 2011.
- AYLWARD, F. O. et al. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **The ISME Journal**, v. 6, n. 9, p. 1688–1701, set., 2012.
- BARANOVA, N.; NIKAIDO, H. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 15, p. 4168–4176, ago., 2002.
- BARBIERI, C. M. et al. Regulation of response regulator autophosphorylation through interdomain contacts. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 42, out., 2010.
- BASTIDA, F. et al. Soil metaproteomics: A review of an emerging environmental science. Significance, methodology and perspectives. **European Journal of Soil Science**, v. 60, n. 6, p. 845–859, 2009.

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.

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

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

BEISIEGEL, V. de R. et al. Geologia e Recursos Minerais da Serra dos Carajás. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 3, n. 4, p. 215–242, out., 1973.

BENADIBA, M.; MAOR, Y. Importance of ABC Transporters in Drug Development. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 38, p. 5817–5829, 2016..

BERGKEMPER, F. et al. Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus recycling systems. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 1988–2000, jun., 2016.

BERKS, B. C. et al. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1232, n. 3, p. 97–173, dez., 1995.

BERNEY, M. et al. An obligately aerobic soil bacterium activates fermentative hydrogen production to survive reductive stress during hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 31, p. 11479–11484, ago., 2014.

BI, S.; LAI, L. Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 691–708, fev., 2015.

BLAGODATSKAYA, E.; KUZUYAKOV, Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 67, p. 192–211, 2013.

BLANCO, A. et al. Lipids. **Medical Biochemistry**, p. 99–119, 1 jan. 2017.

BONATO, P. et al. The NtrY-NtrX two-component system is involved in controlling nitrate assimilation in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 21, p. 3919–3930, nov., 2016.

BONATTO, A. C. et al. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 2, p. 293–299, out., 2007.

BREIER, A. et al. New insight into p-glycoprotein as a drug target. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 159–170, jan., 2013.

BROEHAN, G. et al. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 6, jan., 2013.

BRUSSAARD, L.; DE RUITER, P. C.; BROWN, G. G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 121, n. 3, p. 233–244, jul., 2007.

CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. **Science**, v. 311, n. 5764, p. 1113–1116, fev., 2006.

CAPRA, E. J. et al. Adaptive Mutations that Prevent Crosstalk Enable the Expansion of Paralogous Signaling Protein Families. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 222–232, jul., 2012.

CARRICA, M. del C. et al. The NtrY/X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. **Molecular Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 39–50, jul., 2012.

CAVICCHIOLI, R. et al. The NarX and NarQ sensor-transmitter proteins of *Escherichia coli* each require two conserved histidines for nitrate-dependent signal transduction to NarL. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2416–2424, maio, 1995.

CHAMIZO-AMPUDIA, A. et al. Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. **Trends in plant science**, v. 22, n. 2, p. 163–174, fev., 2017.

CHAN, L.-K.; MORGAN-KISS, R. M.; HANSON, T. E. Functional analysis of three sulfide:quinone oxidoreductase homologs in *Chlorobaculum tepidum*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 1026–34, fev., 2009.

CHEN, P. Y.-T. et al. Binding site for coenzyme A revealed in the structure of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Moorella thermoacetica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 15, p. 3846–3851, abr., 2018.

CHENG, Z.; LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* Proliferation Begins with NtrY/NtrX and PutA/GlnA Upregulation and CtrA Degradation Induced by Proline and Glutamine Uptake. **mBio**, v. 5, n. 6, p. e02141-14, dez., 2014.

CIPOLLONE, R.; ASCENZI, P.; VISCA, P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. **IUBMB Life**, v. 59, n. 2, p. 51–59, fev., 2007.

CLAUSEN, T. et al. Crystal structure of *Escherichia coli* cystathionine gamma-synthase at 1.5 Å resolution. **The EMBO journal**, v. 17, n. 23, p. 6827–6838, dez., 1998.

COLE, J. A.; BROWN, C. M. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. **FEMS Microbiology Letters**, v. 7, n. 2, p. 65–72, fev., 1980.

CORRÊA, G. R. **Pedogênese em platôs de canga ferrífera e basaltos na Serra dos Carajás - PA**. 2011. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de

Viçosa, Viçosa, 2011.

COS, P. et al. Biofilms: An Extra Hurdle for Effective Antimicrobial Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 20, p. 2279–2295, jul., 2010.

CRONAN, J. E.; WALDROP, G. L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 5, p. 407–435, set., 2002.

D'ERRICO, G. et al. Identification and characterization of a novel bacterial sulfite oxidase with no heme binding domain from *Deinococcus radiodurans*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 694–701, jan., 2006.

DAHL, C. Inorganic Sulfur Compounds as Electron Donors in Purple Sulfur Bacteria. In: HELL, R. et al. (eds). **Sulfur metabolism in phototrophic organisms. Advances in photosynthesis and respiration**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 289–317. (volume 27)

DAS, S. K.; VARMA, A. Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. In: SHUKLA, G.; VARMA, A. (eds). **Soil enzymology. soil biology**. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010. p. 25–42. (volume 22)

DAVIDSON, A. L. et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 2, p. 317–364, table of contents, jun., 2008.

DECHO, A. W.; NORMAN, R. S.; VISSCHER, P. T. Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 73–80, fev., 2010.

DELCOUR, J. et al. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. In: Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 1–4, **Anais...** 1999.

DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. Lack of functional redundancy in the relationship between microbial diversity and ecosystem functioning. **Journal of Ecology**, v. 104, n. 4, p. 936–946, jul., 2016.

DICK, G.; SCHUMACHER, M. V. Relações entre solo e fitofisionomias em florestas naturais. **Ecologia e Nutrição Florestal**, v. 3, n. 2, p. 31–39, 2015.

DICK, R. P. **Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health**. [s.l.: s.n.], 1997.

DJORDJEVIC, S.; STOCK, A. M. Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system. **Journal of structural biology**, v. 124, n. 2–3, p. 189–200, dez., 1998.

DJURDJEVIC, I.; EINSLE, O.; DECAMPS, L. Nitrogenase Cofactor: Inspiration for Model Chemistry. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 12, n. 13, p. 1447–1455, jul., 2017.

DREPPER, T. et al. Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen

metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 2, p. 250–256, maio, 2006.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–66, abr., 2002.

EDER, S. et al. A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a *Pho* regulon gene, *phoD*. **Microbiology**, v. 142, n. 8, p. 2041–2047, ago., 1996.

EINSLE, O. et al. Structure of cytochrome c nitrite reductase. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 476–480, jul., 1999.

EL-AWADY, R. et al. The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 535, 2016.

ENDRES, R. G.; WINGREEN, N. S. Precise adaptation in bacterial chemotaxis through “assistance neighborhoods” **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 13040–13044, ago., 2006.

FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. **The microbial engines that drive earth’s biogeochemical cycles** **Science**, 2008.

FEDTKE, I. et al. The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6624–34, dez., 2002.

FINN, R. D. et al. InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D190–D199, jan., 2017.

FINZI, A. C. et al. Responses and feedbacks of coupled biogeochemical cycles to climate change: examples from terrestrial ecosystems. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 9, n. 1, p. 61–67, fev., 2011.

FOWLER, B.; LEONARD, J. V.; BAUMGARTNER, M. R. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 31, n. 3, p. 350–360, jun., 2008.

FRANK, V. et al. Networked Chemoreceptors Benefit Bacterial Chemotaxis Performance. **mBio**, v. 7, n. 6, p. e01824-16, dez., 2016.

FRIGAARD, N.-U.; BRYANT, D. A. Genomic and Evolutionary Perspectives on Sulfur Metabolism in Green Sulfur Bacteria. In: **Microbial Sulfur Metabolism**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 60–76.

GALARZA, M. A.; MACAMBIRA, M. J. B. Geocronologia e Evolução Crustal da Área do Depósito de Cu-Au Gameleira, Província Mineral de Carajás (Pará), Brasil. **Geologia Série Científica USP**, v. 2, p. 143–159, 2002.

GALLOWAY, W. R. J. D. et al. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-

Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 1, p. 28–67, jan., 2011.

GERUSZ, V. Recent Advances in the Inhibition of Bacterial Fatty Acid Biosynthesis. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 295–311, jan., 2010.

GIULIETTI, A. M. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e Lista das Espécies. **Boletim de Botânica**, v. 9, n. 0, p. 1, jun., 1987.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaco Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**, n. JANUARY 1988, p. 39–69, 1988.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M.; BALLIF, B. A. Environmental proteomics, biodiversity statistics and food-web structure. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 8, p. 436–442, 2012.

GRASS, G.; RENSING, C. Genes Involved in Copper Homeostasis in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 6, p. 2145–2147, mar., 2001.

GREENFIELD, L. M. et al. Methodological bias associated with soluble protein recovery from soil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11186, dez., 2018.

GREGOR, J. et al. Bacterial Regulatory Networks Include Direct Contact of Response Regulator Proteins: Interaction of RegA and NtrX in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 1–3, p. 126–139, 2007.

GRIESBECK, C.; HAUSKA, G.; SCHUETZ, M. **Biological Sulfide Oxidation : Sulfide-Quinone Reductase (SQR) , the Primary Reaction**, 2001.

GRIGOROUDIS, A. I. et al. Molecular modeling and functional analysis of the AtoS–AtoC two-component signal transduction system of Escherichia coli. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1770, n. 8, p. 1248–1258, ago., 2007.

GU, Y. et al. Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex. **Nature**, v. 531, n. 7592, p. 64–69, mar., 2016.

GUDIPATY, S. A. et al. Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in Escherichia coli by the sensor kinase CusS. **FEMS Microbiology Letters**, v. 330, n. 1, p. 30–37, maio, 2012.

HATCH, A. J.; ODOM, A. R.; YORK, J. D. Inositol phosphate multikinase dependent transcriptional control. **Advances in Biological Regulation**, v. 64, p. 9–19, maio, 2017.

HELDAL, M.; NORLAND, S.; TUMYR, O. X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1251–7, nov., 1985.

HETTICH, R. L. et al. Microbial metaproteomics: Identifying the repertoire of proteins that

microorganisms use to compete and cooperate in complex environmental communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 373–380, 2012.

HETTICH, R. L. et al. Metaproteomics: Harnessing the power of high performance mass spectrometry to identify the suite of proteins that control metabolic activities in microbial communities. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 9, p. 4203–4214, maio, 2013.

HIGGINS, C. F. **ABC transporters: Physiology, structure and mechanism - An overview** **Research in Microbiology**, 2001.

HU, Y.; RIBBE, M. W. Nitrogenases-A Tale of Carbon Atom(s). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 29, p. 8216–8226, jul., 2016.

HULETT, F. M. et al. Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 5, p. 1348–58, mar., 1994.

HULETT, F. M. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 933–939, 1996.

HUSSAIN, S. et al. Chapter 5 Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. **Advances in Agronomy**, v. 102, p. 159–200, jan., 2009.

ISHIDA, M. L. et al. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 6, p. 651–661, jun., 2002.

ITOU, H.; TANAKA, I. The OmpR-family of proteins: insight into the tertiary structure and functions of two-component regulator proteins. **Journal of biochemistry**, v. 129, n. 3, p. 343–50, mar., 2001.

JACOBI, C. M. et al. Plant communities on ironstone outcrops: A diverse and endangered Brazilian ecosystem. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 7, p. 2185–2200, 2007.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1–2, p. 25–33, 2008.

JACOBI, C. M.; DO CARMO, F. F.; VINCENT, R. D. Estudo Fitossociológico De Uma Comunidade Vegetal Sobre Canga Como Subsídio Para a Reabilitação De Áreas Mineradas No Quadrilátero Ferrífero, Mg. **Revista Arvore**, v. 32, n. 2, p. 345–353, 2008.

JANSA, J.; TRESEDER, K. K. **Introduction : Mycorrhizas and the Carbon Cycle**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

JENKINS, L. S.; NUNN, W. D. Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: the ato system. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 1, p. 42–52, jan., 1987.

JETTEN, M. S. M. **The microbial nitrogen cycle** **Environmental Microbiology**, out. 2008.

JONES, D. L.; OBURGER, E. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 169–198.

JÓNSSON, J. Ö. G.; DAVÍÐSDÓTTIR, B.; NIKOLAIDIS, N. P. Valuation of Soil Ecosystem Services. **Advances in Agronomy**, v. 142, p. 353–384, jan. 2017.

JORDAN, S. et al. Regulation of LiaRS-dependent gene expression in bacillus subtilis: identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 14, p. 5153–66, jul. 2006.

KAMPS, A. et al. Staphylococcal NreB: an O₂-sensing histidine protein kinase with an O₂-labile iron-sulphur cluster of the FNR type. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 713–723, mar. 2004.

KANDELER, E. Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. In: PAUL, E. A. (Ed.). **Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry**. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2007. p. 53–83.

KANEHISA, M. et al. New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Research**, p. 1–6, 2018.

KARACA, A. et al. Soil Enzymes as Indication of Soil Quality. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 119–148.

KAUR, K. et al. DevR (DosR) mimetic peptides impair transcriptional regulation and survival of Mycobacterium tuberculosis under hypoxia by inhibiting the autokinase activity of DevS sensor kinase. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 195, 21 jul. 2014.

KEIBLINGER, K. M. et al. Soil and leaf litter metaproteomics-A brief guideline from sampling to understanding. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 11, p. 1–18, 2016.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In: **The Significance and Regulation of Soil Biodiversity**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. p. 75–86.

KENNEDY, M. C.; ANTHOLINE, W. E.; BEINERT, H. Products of the reaction of cytosolic and mitochondrial aconitases with nitric oxide. **Radicals for Life**, p. 139–145, 1 jan. 2007.

KERTESZ, M. A.; MIRLEAU, P. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 404, p. 1939–1945, 2 jul. 2004.

KLINZING, D. C. et al. The two-component response regulator LiaR regulates cell wall stress responses, pili expression and virulence in group B Streptococcus. **Microbiology (Reading, England)**, v. 159, n. Pt 7, p. 1521–34, jul. 2013.

LEE, J.-M. et al. O₂- and NO-sensing mechanism through the DevSR two-component system in Mycobacterium smegmatis. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 20, p. 6795–804, out., 2008.

LEONHARTSBERGER, S. et al. The *hydH/G* genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 1, p. 93–105, 16 mar. 2001.

LI, D. et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 15 maio 2015.

LINDENMAYER, Z. G.; LAUX, J. H.; TEIXEIRA, J. B. G. Considerações sobre a origem das formações ferríferas da formação Carajás, Serra dos Carajás. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 31, n. 1, p. 21–28, 2001.

LINTON, K. J. Structure and Function of ABC Transporters. **Physiology**, v. 22, n. 2, p. 122–130, abr. 2007.

LIOLIOU, E. E. et al. Phosphorylation activity of the response regulator of the two-component signal transduction system AtoS–AtoC in *E. coli*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1725, n. 3, p. 257–268, 10 out. 2005.

LIOLIOU, E. E.; KYRIAKIDIS, D. A. The role of bacterial antizyme: From an inhibitory protein to AtoC transcriptional regulator. **Microbial cell factories**, v. 3, n. 1, p. 8, 16 jun. 2004.

LIU, D. et al. Microbial functionality as affected by experimental warming of a temperate mountain forest soil—A metaproteomics survey. **Applied Soil Ecology**, v. 117–118, p. 196–202, 2017.

MASCHER, T. et al. Antibiotic-Inducible Promoter Regulated by the Cell Envelope Stress-Sensing Two-Component System LiaRS of *Bacillus subtilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2888–2896, 1 ago. 2004.

MATIAS, S. R. et al. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 3, p. 259–266, 1 maio 2009.

MATTICK, J. S. Type IV Pili and Twitching Motility. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 289–314, out. 2002.

MELLONI, R. Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo. In: SILVEIRA, A. P. D. DA; FREITAS, S. DOS S. (Ed.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomico-IAC, 2007. p. 193–217.

MENZEL, P.; NG, K. L.; KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11257, 13 dez. 2016.

MESUERE, B. et al. The Unipept metaproteomics analysis pipeline. **Proteomics**, v. 15, p. 1437–1442, 2015.

METCALF, W. W.; VAN DER DONK, W. A. Biosynthesis of phosphonic and phosphinic

acid natural products. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 65–94, 2009.

MILNE, E. et al. Soil carbon, multiple benefits. **Environmental Development**, v. 13, p. 33–38, 1 jan. 2015.

MINGES, A. et al. Structural intermediates and directionality of the swiveling motion of Pyruvate Phosphate Dikinase. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45389, 30 dez. 2017.

MITCHELL, A. L. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D351–D360, 8 jan. 2019.

MITRE, S. K. et al. Nutrient and water dynamics of Amazonian canga vegetation differ among physiognomies and from those of other neotropical ecosystems. **Plant Ecology**, v. 219, n. 11, p. 1341–1353, 3 nov. 2018.

MMA. Áreas Prioritárias para Conservação. **Portaria no. 126**, p. 2–3, 2004.

MONTEIRO, G. G. et al. Composição de Comunidades Microbianas de Seis Agroecossistemas em um Solo de Cerrado. **XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2004.

MONTGOMERY, K. et al. Quorum Sensing in Extreme Environments. **Life**, v. 3, n. 1, p. 131–148, 29 jan. 2013.

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

MOTA, N. F. D. O. et al. Vegetação sobre sistemas ferruginosos da Serra dos Carajás. In: CARMO, F. F. DO; KAMINO, L. H. Y. (Ed.). **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais**. Belo Horizonte: 3i, 2015. p. 289–315.

MÜLLNER, M. et al. A PAS Domain with an Oxygen Labile [4Fe-4S] ²⁺ Cluster in the Oxygen Sensor Kinase NreB of *Staphylococcus carnosus* [†]. **Biochemistry**, v. 47, n. 52, p. 13921–13932, 30 dez. 2008.

NANNIPIERI, P. et al. Soil enzymology: classical and molecular approaches. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 7, p. 743–762, 15 out. 2012.

NICHOLLS, D. G. et al. Respiratory Chains. **Bioenergetics**, p. 91–157, 1 jan. 2013.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 313–339, jun. 2003.

NILKENS, S. et al. Nitrate/oxygen co-sensing by an NreA/NreB sensor complex of *Staphylococcus carnosus*. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 381–393, 1 jan. 2014.

NISHINO, K.; NIKAIDO, E.; YAMAGUCHI, A. Regulation of multidrug efflux systems

involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 9066–75, 15 dez. 2007.

NOGALES, J. et al. *Rhizobium tropici* Genes Involved in Free-Living Salt Tolerance are Required for the Establishment of Efficient Nitrogen-Fixing Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 3, p. 225–232, mar. 2002.

NOVICHKOV, P. S. et al. RegPrecise 3.0 – A resource for genome-scale exploration of transcriptional regulation in bacteria. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 745, 1 nov. 2013.

NUNES, J. A. **Florística, estrutura e relações solo-vegetação em gradiente fitosifionômico sobre canga, na Serra Sul, FLONA de Carajás - Pará**. 2009. Universidade Federal de Viçosa, 2009.

NUNES, J. A. et al. Soil-vegetation relationships on a banded ironstone ‘island’, Carajás Plateau, Brazilian Eastern Amazonia. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 4, p. 2097–2110, 2015.

ODHAM, G. et al. Model system for studies of microbial dynamics at exuding surfaces such as the rhizosphere. **Applied and environmental microbiology**, v. 52, n. 1, p. 191–196, jul. 1986.

OSSLUND, T.; CHANDLER, C.; SEGEL, I. H. ATP sulfurylase from higher plants: purification and preliminary kinetics studies on the cabbage leaf enzyme. **Plant physiology**, v. 70, n. 1, p. 39–45, 1 jul. 1982.

OSTERMAN, I. A. et al. Regulation of flagellar gene expression in Bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v. 80, n. 11, p. 1447–1456, 19 nov. 2015.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576–588, 1 set. 2016b.

PARFITT, R. L. Phosphate reactions with natural allophane, ferrihydrite and goethite. **Journal of Soil Science**, v. 40, n. 2, p. 359–369, 1 jun. 1989.

PAULI, G.; OVERATH, P. ato Operon: a highly inducible system for acetoacetate and butyrate degradation in *Escherichia coli*. **European journal of biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 553–62, 25 set. 1972..

PERKINS, D. N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551–3567, 1 dez. 1999.

PORTER, S. C.; NORTH, A. K.; KUSTU, S. Mechanism of Transcriptional Activation by NtrC. In: **Two-Component Signal Transduction**. [s.l.] American Society of Microbiology, 1995. p. 147–158.

PORTO, M. L.; SILVA, M. F. F. Da. Tipos de vegetação metalófitas em áreas da Serra do Carajás e Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, 1989.

PRÁGAI, Z. et al. Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 4, p. 1182–90, 15 fev. 2004.

PRÁGAI, Z.; HARWOOD, C. R. Regulatory interactions between the Pho and σ B-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v. 148, n. 5, p. 1593–1602, 1 maio 2002.

PRANEENARARAT, T.; PALMER, A. G.; BLACKWELL, H. E. Chemical methods to interrogate bacterial quorum sensing pathways. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 10, n. 41, p. 8189–99, 3 out. 2012.

PROSSER, J. I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of “omics” in soil microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 439–446, 2015.

PRÜSS, B. M. Involvement of Two-Component Signaling on Bacterial Motility and Biofilm Development. 2017.

RAVILIOUS, G. E. et al. Kinetic mechanism of the dimeric ATP sulfurylase from plants. **Bioscience reports**, v. 33, n. 4, p. e00053, 25 jul. 2013.

REES, D. C.; JOHNSON, E.; LEWINSON, O. ABC transporters: the power to change. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 3, p. 218–27, mar. 2009.

REINHART, F. et al. Response of the Oxygen Sensor NreB to Air In Vivo: Fe-S-Containing NreB and Apo-NreB in Aerobically and Anaerobically Growing *Staphylococcus carnosus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 86–93, 1 jan. 2010.

REQUENA, J. M. **Stress response in microbiology**. [s.l.] Caister Academic Press, 2012.

RICE, C. W. CARBON CYCLE IN SOILS | Dynamics and Management. **Encyclopedia of Soils in the Environment**, p. 164–170, 1 jan. 2005.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989–996, 1 jul. 2011.

ROMANO, S. et al. Phosphate Limitation Induces Drastic Physiological Changes, Virulence-Related Gene Expression, and Secondary Metabolite Production in *Pseudovibrio* sp. Strain FO-BEG1. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 10, p. 3518–28, 15 maio 2015.

SAINI, D. K.; TYAGI, J. S. High-throughput microplate phosphorylation assays based on DevR-DevS/Rv2027c 2-component signal transduction pathway to screen for novel antitubercular compounds. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 10, n. 3, p. 215–224, 2005.

SALAH UD-DIN, A. I. M.; ROUJEINIKOVA, A. **Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea** *Cellular and Molecular Life*

SciencesSpringer International Publishing, , 13 set. 2017.

SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140–54, fev. 2002.

SCHAEFER, C. E. et al. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. In: CARMO, F. F. DO; KAMINO, L. H. Y. (Ed.). **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais**. Belo Horizonte: 3i, 2015. p. 77–102.

SCHAEFER, C. E. G. R. et al. Geoambientes, solos e estoques de carbono na Serra Sul de Carajás, Pará, Brasil Geoenvironments, soils and carbon stocks at Serra Sul of Carajás, Para State, Brazil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat**, v. 11, n. 1, p. 85–101, 2016.

SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 2844–2854, 1 nov. 2011.

SCHLAG, S. et al. Characterization of the oxygen-responsive NreABC regulon of *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 23, p. 7847–58, 1 dez. 2008.

SCHLESINGER, W. H.; BERNHARDT, E. S. **Biogeochemistry: an analysis of global change**. [s.l.] Academic Press, 2013.

SCHRÖDER, I. et al. Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 16, p. 4985–92, ago. 1994.

SCHUMACHER, M. A. et al. Structures of regulatory machinery reveal novel molecular mechanisms controlling *B. Subtilis* nitrogen homeostasis. **Genes and Development**, v. 29, n. 4, p. 451–464, 2015.

SHANKAR, M. et al. Gene Regulation by the LiaSR Two-Component System in *Streptococcus mutans*. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0128083, 2015.

SHARMA, V. K.; CASEY, T. A. *Escherichia coli* O157:H7 lacking the qseBC-encoded quorum-sensing system outcompetes the parental strain in colonization of cattle intestines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1882–1892, 15 mar. 2014.

SHEN, J. et al. Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant physiology**, v. 156, n. 3, p. 997–1005, 1 jul. 2011.

SILVA, M. F. F. da. Distribuição de metais pesados na vegetação metalófica de Carajás. **Acta Botanica Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 107–122, jul. 1992.

SILVA, M.; SECCO, R.; LOBO, M. Aspectos ecológicos da vegetação rupestre da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 26, n. 1–2, p. 17–44, jun. 1996.

SILVERSMITH, R. E. et al. Phosphoryl Group Flow within the *Pseudomonas aeruginosa* Pil-Chp Chemosensory System: DIFFERENTIAL FUNCTION OF THE EIGHT PHOSPHOTRANSFERASE AND THREE RECEIVER DOMAINS. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 34, p. 17677–91, 19 ago. 2016.

SKIRYCZ, A. et al. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. November, p. 1–9, 2014.

STAMFORD, N. P. et al. Microbiologia dos solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 339.

STINCONE, A. et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. **Biological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 927–963, 1 ago. 2015.

STÜLKE, J.; SCHMALISCH, M. H. The bacterial phosphotransferase system: a perfect link of sugar transport and signal transduction. In: [s.l: s.n.]p. 179–205.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254–267, 17 out. 2014.

SUNTHARALINGAM, P. et al. The LiaFSR System Regulates the Cell Envelope Stress Response in *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 9, p. 2973–2984, 1 maio 2009.

TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. In: **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

TADANO, T. et al. Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. **Plant and Soil**, v. 155–156, n. 1, p. 95–98, out. 1993.

TRUJILLO, M. et al. Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration. **Nitric Oxide**, p. 61–102, 1 jan. 2010.

TYC, O. et al. Exploring bacterial interspecific interactions for discovery of novel antimicrobial compounds. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 910–925, 1 jul. 2017.

UTOBO, E. B.; TEWARI, L. Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 13, n. 1, p. 147–169, 2015.

VASCONCELOS, J. M. et al. Solos metalíferos: atributos químicos nas diferentes fitofisionomias da Serra Sul, Serra dos Carajás, Pará, Brasil Metalliferous soils: chemical attributes in different phytophysiognomies of the Serra Sul, Serra dos Carajás, Pará, Brazil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat**, v. 11, n. 1, p. 49–55, 2016.

VIANA, P. L. et al. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: História, área de

estudos e metodologia. **Rodriguesia**, v. 67, n. 5, p. 1107–1124, 2016.

WADHAMS, G. H.; ARMITAGE, J. P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 12, p. 1024–1037, 1 dez. 2004.

WANG, D.-Z. et al. Environmental Microbial Community Proteomics: Status, Challenges and Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1275, 5 ago. 2016.

WANG, W. et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2782–2786, 1 jul. 2006.

WHITE, A. K.; METCALF, W. W. Microbial Metabolism of Reduced Phosphorus Compounds. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 379–400, out. 2007.

WILHELM SCHERER, H. Sulfur in soils. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, n. 3, p. 326–335, 1 jun. 2009.

WILMES, P.; BOND, P. L. Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 92–97, 2006.

WILMES, P.; HEINTZ-BUSCHART, A.; BOND, P. L. A decade of metaproteomics: Where we stand and what the future holds. **Proteomics**, v. 15, n. 20, p. 3409–3417, 2015.

WRIGHT, L.; POPE, C.; LIU, J. The Nervous System as a Target for Chemical Warfare Agents. **Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents**, p. 463–480, 1 jan. 2009.

WU, J. Y.; SIEGEL, L. M.; KREDICH, N. M. High-level expression of Escherichia coli NADPH-sulfite reductase: requirement for a cloned *cysG* plasmid to overcome limiting siroheme cofactor. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 1, p. 325–33, jan. 1991.

XIAO, M. et al. Osmotolerance in Escherichia coli Is Improved by Activation of Copper Efflux Genes or Supplementation with Sulfur-Containing Amino Acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 7, 1 abr. 2017.

YEH, K. C. et al. A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5331, p. 1505–8, 5 set. 1997.

YI, H. et al. Sensing Sulfur Conditions: Simple to Complex Protein Regulatory Mechanisms in Plant Thiol Metabolism. **Molecular Plant**, v. 3, n. 2, p. 269–279, 1 mar. 2010.

ZHANG, W. et al. Ecosystem services and dis-services to agriculture. **Ecological Economics**, v. 64, n. 2, p. 253–260, 15 dez. 2007.