



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GILBERTO DE AGUIAR PEREIRA

**ESTUDO DE COMUNIDADES BACTERIANAS  
OBTIDAS DE SOLO/SERAPILHEIRA  
NO PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY**

---

Londrina  
2019



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**

**INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA**

---

**GILBERTO DE AGUIAR PEREIRA**

**ESTUDO DE COMUNIDADES BACTERIANAS  
OBTIDAS DE SOLO/SERAPILHEIRA  
NO PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY**

---

**Londrina – Paraná  
2019**

**GILBERTO DE AGUIAR PEREIRA**

**ESTUDO DE COMUNIDADES BACTERIANAS  
OBTIDAS DE SOLO/SERAPILHEIRA  
NO PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pereira, Gilberto de Aguiar.

Estudo de comunidades bacterianas obtidas de solo/serapilheira no Parque Estadual Mata dos Godoy / Gilberto de Aguiar Pereira. - Londrina, 2019.  
95 f. : il.

Orientador: Fernando Gomes Barcellos.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Bactérias - Tese. 2. Predição funcional - Tese. 3. Mata Atlântica - Tese. 4. Metabarcoding - Tese. I. Barcellos, Fernando Gomes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

**GILBERTO DE AGUIAR PEREIRA**

**ESTUDO DE COMUNIDADES BACTERIANAS OBTIDAS DE  
SOLO/SERAPILHEIRA NO PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**



Londrina, 25 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho a minha família e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora por todas as contribuições.

A todos os meus amigos de dentro e fora da UEL pela parceria.

Aos colegas de laboratório pela boa convivência.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

A minha mãe, pai e irmã, Maria de Lourdes de Aguiar Pereira, Sebastião Pereira Neto e Rosiéle de Aguiar Pereira pelo apoio incondicional.

E especialmente a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

**Muito obrigado!**

“Andar com fé eu vou,  
que a fé não costuma faiá”.

(Gilberto Gil)

PEREIRA, Gilberto Aguiar. **Estudo de comunidades bacterianas obtidas de solo/serapilheira no Parque Estadual Mata dos Godoy**. 2019. 95 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

O solo/serapilheira de cada ambiente florestal oferece inúmeros microhabitats únicos para o desenvolvimento dos microrganismos, contudo, mesmo diante de toda essa multiplicidade e da possibilidade que elas desapareçam, as florestas tropicais e subtropicais são pouco estudadas sob esta perspectiva, por isso, pesquisas com esta temática devem ser celeremente e amplamente realizadas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar as comunidades bacterianas obtidas a partir de amostras de solo/serapilheira coletadas em abril e outubro numa floresta semidecidual subtropical pertencente ao Parque Estadual Mata dos Godoy (Londrina – sul do Brasil) e ao bioma Mata Atlântica. Para isso, análises de composição, diversidade, correlação, construção de mapas taxonômicos funcionais e de perfis metagenômicos preditivos foram conduzidos a partir do sequenciamentos de alto rendimento do gene 16S rRNA, utilizando o ambiente R, o portal METAGENssistant, análise química do solo e ainda ensaios enzimáticos *in vitro*. Como resultado, obteve-se no total, 267.819.585 pb e 26 filis bacterianos. Além disso, constatou-se que no mês de abril a comunidade bacteriana foi mais rica e diversa do que no mês de outubro. Constatou-se ainda que existem dois padrões de ocorrência para os fatores ambientais e que eles são responsáveis por 80,41% da dissimilaridade entre os dois conjuntos de amostras estudadas e as principais atribuições fenotípicas recuperadas através de predições foram relacionadas aos ciclos biogeoquímicos do enxofre, nitrogênio e carbono, metabolismo de pesticidas e a produção do antibiótico estreptomicina. Adicionalmente, ao se investigar melhor as atribuições fenotípicas relacionadas ao metabolismo do carbono, a atividade da enzima cellulose-1,4- $\beta$ -cellobiases (EC 3.2.1.91) confirmou *in vitro* o resultado das análises realizadas *in silico*. Dessa forma, pôde-se concluir que existe um padrão de ocorrência de filis bacterianos no solos/serapilheira florestais e que o padrão de correlação destes filis com os fatores ambientais possivelmente é característico de cada local. Pôde se concluir também que o *workflow* utilizado neste trabalho podem vir a se tornar uma alternativa as análises atualmente utilizada em estudos *metabarcoding* do gene 16S rRNA, contribuindo assim inclusive com a elaboração de novos *insights* e hipóteses para o delineamento experimental de projetos futuros.

**Palavras chave:** Bactéria. Mata Atlântica. *Metabarcoding*. Predição funcional. 16S rRNA.

PEREIRA, Gilberto Aguiar. **study of bacterial communities obtained from soil/litter in the State Park Mata dos Godoy**. 2019. 95 p. Thesis (Doctorate in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

### ABSTRACT

The soil/litter of each forest environment offers innumerable unique microhabitats for development of microorganisms, however, under this perspective, tropical and subtropical forests are little studied, therefore, research on this subject need to realize briefly and widely. In this perspective, the objective of this work was to study the bacterial communities obtained from soil/litter samples collected in April and October in a semi-deciduous subtropical forest belonging to Parque Estadual Mata dos Godoy (Londrina - south of Brazil) and the Atlantic Rainforest. For this, analyzes of composition, diversity, correlation, construction of functional taxonomic maps and predictive metagenomic profiles were conducted from the high throughput sequencing of the 16S rRNA gene, using the R environment, the METAGENssistant portal, soil chemical analysis and enzymatic assays in vitro. It obtained as initially result, 267.819.585 pb and 26 bacterial phyla. In addition, in April the bacterial community was richer and more diverse than the bacterial community of October was. Moreover, there are two patterns of occurrence for metadata and these factors contribute with 80.41% of the dissimilarity between two sets of samples studied. The main phenotypic attributions recovered through predictions were those related to biogeochemical cycles of sulfur, nitrogen and carbon, pesticide metabolism and the production of the antibiotic streptomycin. In addition, the predicted activity of an enzyme was confirmed in vitro [cellulose-1,4- $\beta$ -cellobiases enzyme (EC 3.2.1.91)]. In conclusion, there is a pattern of occurrence of bacterial phyla in the soils/litter and the correlation pattern are possibly characteristic of each specific site. Furthermore, the workflow used in this work may come to become an alternative to the analysis currently used in 16S rRNA metabarcoding sequencing studies because it contributes with the development of new insights and hypotheses for the experimental design of future projects.

**Keywords:** Atlantic Rainforest. Bacteria. Metabarcoding. Prediction. 16S rRNA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Distribuição geográfica de estudos de campo em serapilheira e madeira morta nos últimos 10 anos (o tamanho dos círculos é proporcional ao número de artigos focados numa região específica).....	20
Figura 02 –	Fatores bióticos e abióticos que influenciam o desenvolvimento da comunidade bacteriana nos solos florestais .....	21
Figura 03 –	Principais etapas de estudos <i>metabarcoding</i> em amostras ambientais. ....	22
Figura 04 –	Abordagens utilizadas na extração de DNA bacteriano do solo.....	24
Figura 05 –	Representação esquemática do sequenciamento de DNA realizado a partir da metodologia de terminação reversível das cadeias de DNA. ....	25
Figura 06 –	Citação do MG-RAST no Pubmed no período entre 2009 e 2019. ....	27
Figura 07 –	<i>Pipeline</i> de análise <i>upstream</i> antes da obtenção da OTU <i>table</i> realizada pela ferramenta online <i>Metagenomic Analysis Server</i> – MG-RAST. ....	27
Figura 08 –	Como interpretar um correlograma do pacote <i>corplot</i> do R (WEI et al., 2017). ....	34
Figura 09 –	Localização do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).....	35
Figura 10 –	Mapa de Solos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG). ....	36
Figura 11 –	Perfil esquemático destacando a estrutura de um segmento de uma Floresta Estacional Semidecidual. ....	37
Figura 12 –	Porcentagem de dias com precipitações pluviométricas mínimas de 1 milímetro.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 –	Principais ferramentas on-line utilizadas para estudos <i>metabarcoding</i> .....	26
Tabela 02 –	Servidores online mais populares para análises <i>downstream</i> após a obtenção da OTU <i>table</i> de acordo com as ferramentas que possuem.....	29
Tabela 03 –	Pacotes R especificamente destinados à análise metagenômica/metabarcoding comumente utilizados para: comparação de dois ou mais grupos (ALDEx2), abordagens avançadas baseadas em modelos lineares generalizados que permitem a análise de fatores contínuos e discretos (metagenomeSeq, edgeR, DESeq2) e os métodos para comparação de vetores (HMP, vegan).....	31
Tabela 04 –	Índices de biodiversidade mais utilizados.....	32
Tabela 05 –	Ficha técnica do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).....	35

## SUMÁRIO

<b>1 –</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 –</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1 –	Serapilheira.....	17
2.2 –	Estudos sobre a Serrapilheira em Florestas Estacionais Semidecíduais Brasileiras .....	18
2.3 –	Microrganismos na serapilheira .....	19
2.4 –	Fatores bióticos e abióticos que influenciam o desenvolvimento da comunidade bacteriana no solo/serapilheira.....	20
2.5 –	Estudos <i>metabarcoding</i> .....	21
2.5.1 –	Amostragem .....	23
2.5.2 –	Extração de DNA e PCR.....	23
2.5.3 –	Sequenciamento de DNA .....	24
2.5.4 –	Análises dos Resultados do Sequenciamento.....	25
2.5.4.1 –	Análises upstream antes da obtenção da OTU table .....	25
2.5.4.2 –	Análises downstream depois da obtenção da OTU table .....	28
I –	Análises Composicionais .....	31
II –	Análises de diversidade .....	32
III –	Análises de correlação.....	33
IV –	Análises funcionais.....	34
2.6 –	Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).....	34
2.6.1 –	Estudos microbiológicos no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).....	38
<b>3 –</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	40

<b>4 –</b>	<b>ARTIGO: Análises taxonômico-metabólicas conduzidas a partir do solo/serapilheira de uma floresta estacional semidecidual subtropical pertencente ao bioma Mata Atlântica .....</b>	<b>41</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>42</b>
	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>44</b>
	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
	<b>RECURSOS DA INTERNET .....</b>	<b>67</b>
	<b>TABELAS 1-3 .....</b>	<b>68</b>
	<b>FIGURAS 1-6 .....</b>	<b>73</b>
	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR .....</b>	<b>79</b>
<b>5 –</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>6 –</b>	<b>ANEXOS 1 a 4 .....</b>	<b>92</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos ecossistemas mais biodiversos do planeta Terra, no entanto, a megabiodiversidade deste bioma não é homoganeamente distribuída, e por isso, ela pode ser dividida em 15 ecorregiões que compartilham grande parte de suas espécies, dinâmicas e condições ambientais (DI BITETTI; PLACCI; DIETZ, 2003). Entre todas elas, a ecorregião Floresta Alto Paraná (EFAP) era a mais extensa (28.565.777 ha), contudo, atualmente esta área foi reduzida a somente 2,7% da sua área original no Brasil (DI BITETTI; PLACCI; DIETZ, 2003). O Parque Estadual Mata dos Godoy (Londrina – PR) abriga um dos poucos remanescente florestais pertencentes a EFAP e por isso foi a Unidade de Conservação do Paraná selecionada para a realização deste estudo.

A ecorregião Floresta Alto Paraná é composta predominantemente por florestas estacionais semidecíduais que em função de estarem sujeitas a um clima estacional, apresentam semidecidualidade da cobertura de todo o seu conjunto florestal que pode perder entre 20 e 50% das folhas na estação com menor incidência de chuvas (IBGE, 2012). Em consequência a este acontecimento, parte desse material vegetal será incluído às camadas mais superficiais do solo, tornando estes locais, lugares privilegiados para o desenvolvimento de investigações microbiológicas (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015).

Em se tratando de estudos microbiológicos, o cultivo é a metodologia padrão ouro para caracterização dos microrganismos, pois a partir dele, estudos bioquímicos, fisiológicos e genéticos podem ser conduzidos, no entanto, o sequenciamento de alto rendimento vêm se consolidando como uma alternativa viável à utilização desta metodologia (HUGERTH; ANDERSSON, 2017), pois possibilita que estudos ecológico-funcionais sejam realizados de forma independente de isolamento, purificações ou cultivos. Neste sentido, o gene 16S rRNA tem sido selecionado para a realização destes estudos, pois apesar de ser historicamente utilizado em análises taxonômicas e filogenéticas, atualmente ele também pode ser utilizados para prever a abundância de genes funcionais em comunidades microbianas através da construção dos perfis metagenômicos preditivos (WOOD, 2016).

Estudos *metabarcoding* utilizando o gene 16S rRNA reduzem significativamente a quantidade de dados necessários para que ao menos se conheça os perfis funcionais das comunidades microbianas e por isso, são considerados um ponto de partida econômico e lógico que contribuem com a elaboração de novos *insights* e hipóteses que podem inclusive vir a redirecionar o delineamento experimental de projetos futuros; contribuindo desta forma,

com que as ferramentas que são utilizadas com esta finalidade, assim como o Tax4fun (ABHAUER et al., 2015) se consolidem como novas opções para complementar estudos sobre comunidades bacterianas investigadas a partir de sequenciamentos do gene 16S rRNA.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Serapilheira

Serapilheira, serrapilheira, liteira ou foliço são os termos mais utilizados para referir-se a camada mais superficial do solo, na qual se incorpora por deposição, restos de animais e os componentes senescentes da parte aérea das plantas como as folhas, frutos, sementes, cascas e gravetos. Todos os termos citados anteriormente são sinônimos e representam tentativas de traduzir para a língua portuguesa o termo em inglês *forest litter* (GOMES et al., 2009). Neste trabalho, o termo serapilheira foi o termo selecionado para referir-se a este local.

A formação e manutenção da serapilheira está associada a taxa de deposição e também a taxa de decomposição dos resíduos que são incorporadas a este horizonte orgânico do solo (GEETHANJALI; JAYASHANKAR, 2016). A deposição dos resíduos sobre o solo está diretamente relacionada a fatores como o clima (precipitação e temperatura), o solo (quantidade de nutrientes e água necessários para a produção de fitomassa) e idade, densidade e diversidade do povoamento florestal; já a decomposição é regulada pelas características do material orgânico, a natureza da comunidade decompositora e pelas condições físico-químicas do ambiente (altitude, latitude e tipo de floresta) (MISHRA; KUMAR, 2016). Desta forma, a espessura da serapilheira está diretamente associada ao ajuste fino entre estes dois processos, sendo assim, caso o processo de deposição supere o de decomposição a espessura da serapilheira será maior, no entanto, caso o processo de decomposição seja mais efetivo, a espessura da serapilheira será menor.

Neste sentido, para além da função de camada depositária de resíduos, a serapilheira acumulada exerce um papel fundamental na disponibilização de nutrientes para o crescimento das plantas e microrganismos, sendo este último grupo beneficiado duplamente, pois há também a possibilidade que eles se desenvolvam numa grande variedade de microhabitats que este ambiente lhes oferece. Além de tudo isso, a serapilheira acumulada atua também como isolante térmico (melhoras as condições térmicas dos horizontes mais profundos), atenuador de efeitos erosivos e também como um filtro armazenador de água proveniente da atmosfera que penetra no solo (PARRON et al., 2015). Assim, ao participar de vários processos funcionais dos ecossistemas nos quais estão inseridas, a serapilheira presta inestimáveis serviços ambientais que inclusive possuem reflexos sobre questões pertinentes ao bem estar humano, evidenciando a sua grande importância.

## 2.2 – Estudos sobre a Serapilheira em Florestas Estacionais Semidecíduais Brasileiras

O conceito ecológico da Floresta Estacional Semidecidual é estabelecido em função da ocorrência de clima estacional que determina a semidecidualidade da cobertura de todo o conjunto florestal que pode perder entre 20 e 50% das folhas na estação com menor incidência de chuvas (IBGE, 2012). Em consequência a este acontecimento, parte do material vegetal será incluído as camadas mais superficiais do solo destas florestas, tornando-as então, locais privilegiados para o desenvolvimento de investigações sobre a serapilheira.

Nesta perspectiva, Vital e colaboradores (2004) desenvolveram a sua investigação em uma mata ciliar com vegetação do tipo Floresta Estacional Semidecidual, localizada no centro-sul do Estado de São Paulo. A partir das informações que coletaram, obtiveram como resultados que a produção anual total de serapilheira foi de  $10.646,0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$ , sendo que a maior deposição ocorreu no fim da estação seca e ainda observaram que o tempo necessário para o desaparecimento de 95% dos resíduos depositados foi de 639 dias.

Já Pezzatto e Wisniewski (2006), estudaram diferentes seres sucessionais de uma Floresta Estacional Semidecidual ao longo das margens do reservatório de uma hidrelétrica do oeste do estado do Paraná e obtiveram como resultado que a produção anual total de serapilheira foi de  $10.372,39 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$ , além disso, puderam observar que a quantidade da serapilheira depositada, apresenta uma correlação positiva significativa com a velocidade média dos ventos e uma correlação negativa significativa com a umidade relativa do ar.

Adicionalmente, Pinto e colaboradores (2008) desenvolveram sua pesquisa em um município pertencente a zona da mata mineira, em uma estação de pesquisa e educação ambiental; neste local, obtiveram como resultado que a produção anual de serapilheira na “floresta madura” foi de  $8.819 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$ , além disso, constataram que a serapilheira era composta predominante pela fração foliar (55,9%), seguida das frações ramos (36,4%), frutos e sementes (6,2%) e flores (1,5%). Ainda observaram que apesar de ser produzida de forma contínua ao longo de todo o período analisado que apresentou um modelo sazonal para a produção total de serapilheira onde os maiores valores de deposição foram observados no período da primavera.

Inserindo-se então neste contexto e compartilhando algumas das peculiaridades inerentes a cada estudo já apresentado, o Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) também já foi objeto de estudos sobre a serapilheira. Pimenta e colaboradores (2011) constataram que a produção anual de serapilheira no PEMG foi de  $8.212 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$ , sendo a fração foliar responsável pela maior parte da deposição (79%) e que outubro foi o mês com maior

deposição de biomassa comparado ao mês de abril; além disso, constataram também que a taxa instantânea de decomposição (K) foi de 2,45 e que a floresta do PEMG apresenta produção de serapilheira e ciclagem de nutrientes características de uma Floresta Estacional Semidecidual bem preservada.

É possível notar através da descrição dos trabalhos apresentados nessa seção, que mesmo sendo locais privilegiados para o desenvolvimento de investigações sobre as comunidades microbianas na serapilheira, não se conseguiu encontrar até a presente data trabalhos com esta temática em Florestas Estacionais Semidecíduais no Brasil.

### 2.3 - Microrganismos na serapilheira

Ao contrário do que se pensava, a comunidade de microrganismos não é amplamente distribuída pelo solo, ela possui distribuição restrita e ocorre em microambientes que compreendem menos de 1% do volume total deste ecossistema, os chamados *hotspots* (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015). Nestes locais, os microrganismos só deixam o seu estado dormente quando eventos biológicos como a deposição de resíduos sobre serapilheira acontece, neste sentido, este evento e este momento (*hotmoment*), são considerados muito importantes para a comunidade microbiana, pois, entre outras coisas, permite que a biomassa de microrganismos ativos nesta camada, chegue a ser de 4 a 20 vezes maior do que em outros locais do solo (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015); evidenciando assim, a importância para os microrganismos.

Ainda com relação aos microrganismos, os fungos são considerados os melhores degradadores da serapilheira, pois possuem um sistema de enzimas extracelulares eficientes para degradá-la (ŠTURSOVÁ et al., 2012), capacidade de penetrar em materiais sólidos (FOUDYL-BEY et al., 2016) e resistência ao pH ácido, condições que privilegiam o crescimento destes microrganismos (GROSSO et al., 2016). No entanto, as bactérias são mais eficientes em absorver as moléculas de carbono e em disponibilizar nitrogênio (macronutrientes essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos) (ŠTURSOVÁ et al., 2012), e por estes motivos, podem ser consideradas também como participantes importantes desses processos.

Em se tratando das bactérias, os filos bacterianos mais abundantemente encontrados em todos os estágios sucessionais na decomposição da serapilheira são Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes (PURAHONG et al., 2016). No entanto, é preciso destacar que o padrão de ocorrência de microrganismos na serapilheira está mais relacionado com os

resultados encontrados nas regiões boreais e temperadas (Figura 01) e que as florestas tropicais e subtropicais são pouco estudadas sob esta perspectiva (BANI et al., 2018). Desta forma, é fundamental que estudos com microrganismos cultiváveis e não cultiváveis obtidos a partir do solo/serapilheira destas florestas sejam realizados.

Figura 01 - Distribuição geográfica de estudos de campo em serapilheira e madeira morta nos últimos 10 anos (o tamanho dos círculos é proporcional ao número de artigos focados numa região específica).

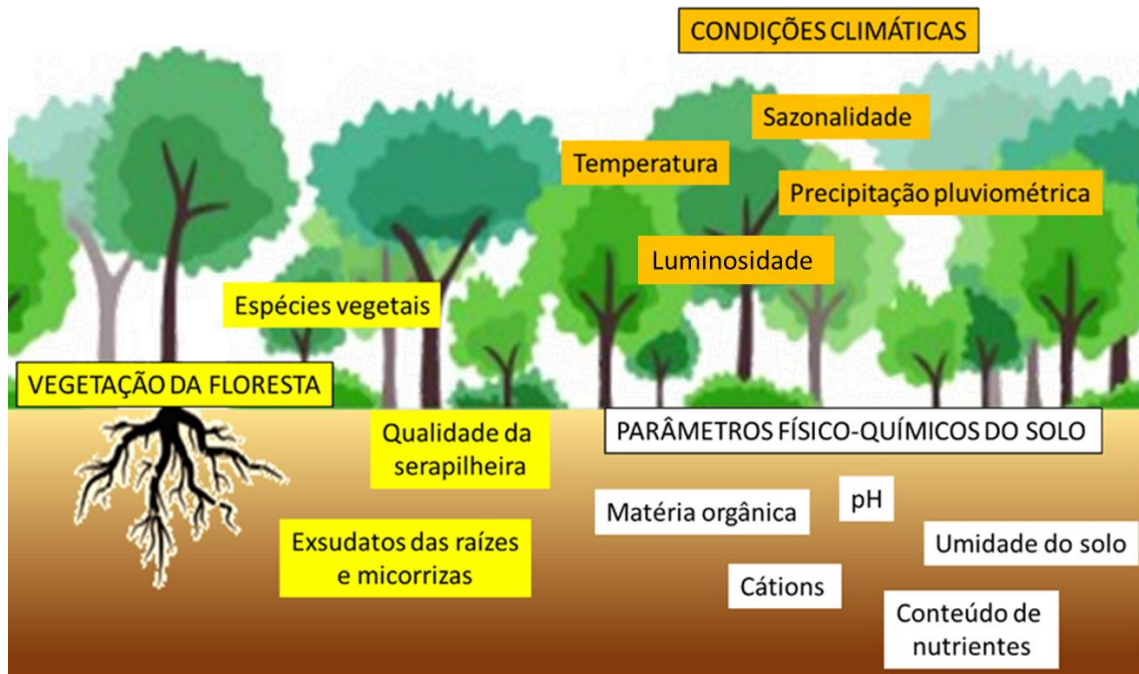


Fonte: BANI e colaboradores, 2018

2.4 – Fatores bióticos e abióticos que influenciam o desenvolvimento da comunidade bacteriana no solo/serapilheira.

É preciso salientar também que assim como os processos de formação e manutenção da serapilheira, a composição das comunidades bacterianas presentes nestes locais, também podem ser influenciadas por fatores como: os parâmetros físico-químico do solo, as condições climáticas e a diversidade e identidade do povoamento florestal (Figura 02).

Figura 02 - Fatores bióticos e abióticos que influenciam o desenvolvimento da comunidade bacteriana nos solos florestais



Adaptado de Lladó, López-Mondéjar e Baldrian (2017)

Adicionalmente, Romanowicz e colaboradores (2016) destacam que entre os fatores citados na Figura 02, a umidade, o pH, o conteúdo de carboxila, bem como as concentrações de C e N, são fatores preponderantes para a composição de comunidades bacterianas totais e ativas nos solos florestais e por isso são considerados fatores que direcionam este processo.

## 2.5 – Estudos *metabarcoding*

Tradicionalmente em estudos microbiológicos, inclusive nos solos/serapilheiras, o cultivo é a metodologia padrão ouro para que se caracterize os microrganismos. Contudo, estima-se que somente 1% das bactérias ambientais e de 30-40% das bactérias do trato intestinal humano possam ser usualmente cultivadas *in vitro* (VARTOUKIAN, 2016). Desta forma, como a maioria das bactérias permanece ainda não cultivável, a composição de comunidades bacterianas em ambientes como a água, o ar e o solo inevitavelmente é subestimada quando métodos baseados em cultivo são utilizados. Neste contexto, o sequenciamento de DNA de alto rendimento vêm se consolidando como uma alternativa viável à utilização desta metodologia (HUGERTH; ANDERSSON, 2017). Neste sentido, as

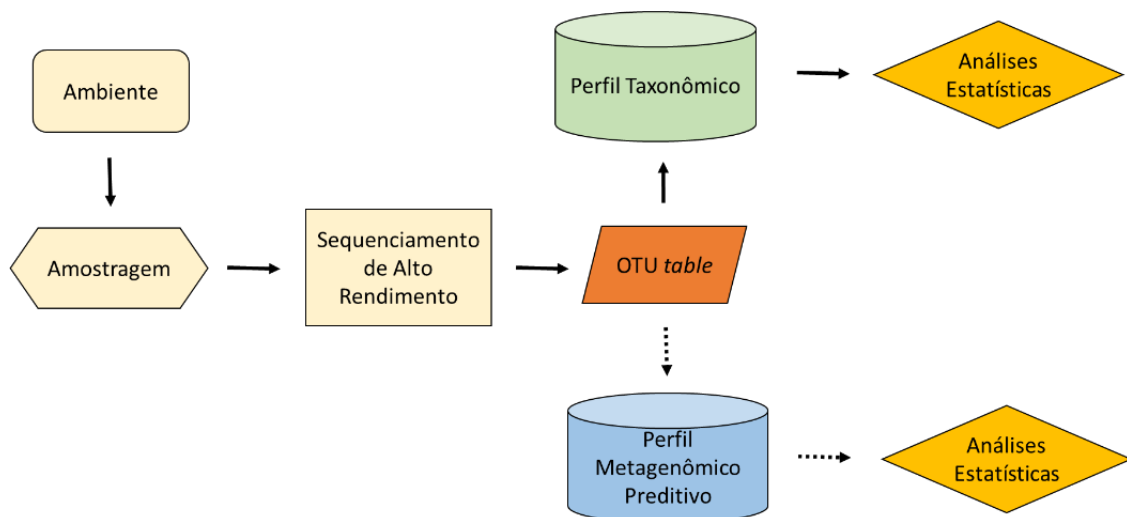
comunidades bacterianas obtidas a partir de amostras ambientais podem ser estudadas através de sequências obtidas de genomas (metagenomas) ou então de genes marcadores taxonômicos específicos (*metabarcoding*).

Estudos metagenômicos são muito úteis na caracterização funcional de comunidades microbianas, mas são relativamente caros e requerem procedimentos complexos de modelagem e análise de dados. Desta forma, estudos *metabarcoding* permanecem essenciais em muitos estudos ecológicos microbianos, pois se baseiam no sequenciamento de sub-regiões hipervariáveis curtas amplificadas por PCR, o que permite uma maior profundidade no sequenciamento sem impactar grandemente nos custos para a sua realização (RAMIRO-GARCIA et al., 2019).

Estudos relacionados a composição microbiana na serapilheira e madeira presentes nos solos florestais confirmam esta afirmação, já que de acordo com Bani e colaboradores (2018) 53% dos estudos relacionados a estes locais utilizaram sequenciamento de alto rendimento no período entre 2007 e 2017.

Estudos *metabarcoding* envolvem uma série de etapas que incluem desde a coleta de amostras, extração e sequenciamento de DNA até as análises de bioinformática *upstream* e *downstream* da obtenção da tabela de Unidades Taxonômicas Operacionais (*OTU table*) (Figura 03). A seguir cada etapa será descrita brevemente em subitens deste mesmo tópico.

Figura 03 – Principais etapas de estudos *metabarcoding* em amostras ambientais.



Adaptado de Mataragas e colaboradores (2018)

### 2.5.1 - Amostragem

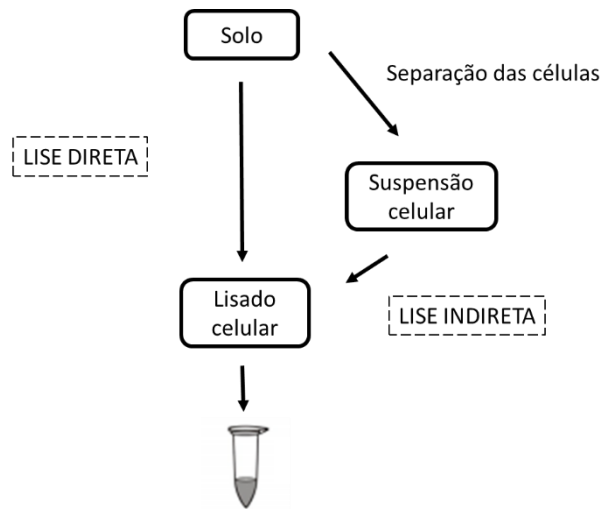
Uma amostragem representativa é um ponto chave em muitos estudos científicos, inclusive nos de *metabarcoding*. No caso dos solos florestais, a amostragem deve conter replicatas, considerar os aspectos temporais, espaciais e de escala que sejam relevantes para cada estudo e também tentar reduzir a variabilidade existente na microescala (LOMBARD et al., 2011). Belánger e Van Rees (2008) sugerem ainda aumentar a superfície de solo coletado para tornar as amostras mais representativas. Estes mesmos autores também recomendam que as amostras de solos florestais sejam obtidas de transectos e que cubram individualmente pelo menos 200 cm<sup>2</sup>.

De acordo com Belánger e Van Rees (2008) as amostras podem ser obtidas através de duas técnicas: solo *core* e modelo quadrado. No primeiro caso, um cilindro de aço afiado corta o solo florestal sem dificuldade e por isso é relativamente simples obter amostras através desta técnica. No segundo caso, as amostras são obtidas através de aparatos quadrados que são construídos com metais mais pesados com tampas de madeira e com armações que ajudam a inserção destes instrumentos no solo florestal. A obtenção de amostras por esta técnica apresenta maior dificuldade do que a realizada a partir da técnica do solo *core*, contudo, ela permite que parâmetros como espessura, a massa úmida, massa seca, densidade e teor de água sejam estudados mais fidedignamente. Desta forma, a escolha da técnica a ser utilizada na coleta dos solos florestais devem levar em conta os objetivos do estudo e também as vantagens e desvantagens que cada uma delas oferece.

### 2.5.2 – Extração de DNA e PCR

Atualmente, duas abordagens são utilizadas para a extração de DNA bacteriano obtidos a partir de amostras de solo (Figura 04): a extração direta, onde a lise celular ocorre na matriz do solo e em seguida o DNA é extraído e purificado e a extração indireta, onde as células bacterianas são primeiramente extraídas da matriz do solo e somente num segundo momento estas células são lisadas e o DNA é extraído e purificado (FELCZYKOWSKA et al., 2015).

Figura 04 - Abordagens utilizadas na extração de DNA bacteriano do solo.



Adaptado de Rajendhran e Gunasekaran (2008)

O método de extração direta de DNA é mais rápido do que o método indireto e muitas vezes produz entre 10 e 100 vezes mais DNA do que a lise indireta, contudo, o método de extração indireta libera DNA de alta qualidade e com menos contaminação exógena. Então, mesmo apresentando algumas desvantagens em relação ao método de extração indireto, o método de extração direto comumente é o selecionado para a realização de estudos *metabarcodings*, pois aparentemente o rendimento é maior e o processo de obtenção de DNA é mais rápido (LOMBARD et al., 2011).

Após a extração de DNA, num estudo de *metabarcoding*, um gene marcador taxonômico específico é amplificado através de PCR. No caso de estudos de comunidades bacterianas e das arqueias, o gene 16S rRNA é o gene padrão ouro para o desenvolvimento de estudos filogenéticos e por isso mesmo é um gene amplamente utilizado em estudos *metabarcoding* (RAMAZZOTTI; BACCI, 2018).

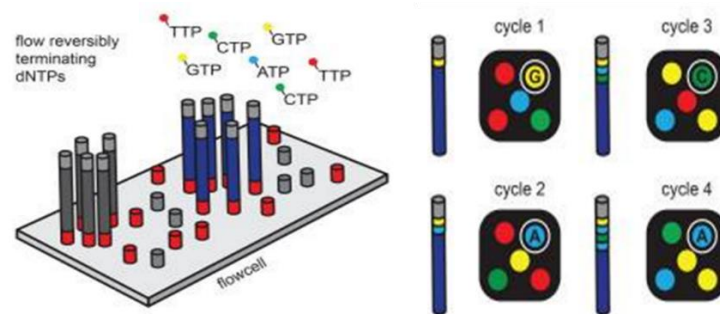
### 2.5.3 – Sequenciamento de DNA

Atualmente quatro empresas possuem sequenciadores automáticos capazes de produzir sequenciamento de DNA de alto rendimento; contudo o método que utiliza a terminação reversível das cadeias de DNA (TRCD), há tempos dominam o mercado e a quantidade de DNA de alto rendimento produzidos (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015).

O sequenciamento de alto rendimento por TRCD, envolve inicialmente à amplificação de moldes de DNA por clonagem na superfície de uma *flowcell*, onde ocorre o

sequenciamento através de sucessivas rodadas de incorporação de base, lavagem e obtenção de imagens por uma câmera CCD (após a aquisição de uma imagem, um passo de clivagem, remove o corante fluorescente e regenera o 3'OH para um próximo ciclo). A análise de imagens de quatro cores é usada para determinar a composição das bases que então são transformadas em arquivos com extensões variáveis a partir dos quais é possível realizar diversas análises posteriores (Figura 05).

Figura 05 – Representação esquemática do sequenciamento de DNA realizado a partir da metodologia de terminação reversível das cadeias de DNA.



Fonte: Reuter, Spacek e Snyder (2015)

#### 2.5.4 – Análises dos Resultados do Sequenciamento

- Análises *upstream* antes da obtenção da OTU *table*

As etapas computacionais típicas necessárias para análise inicial dos dados *metabarcoding* obtidos por sequenciamentos de alto rendimento por TRCD consistem em: filtrar as sequências que têm qualidade ruim, eliminar os adaptadores utilizados no sequenciamento, mesclar as sequências (com base na sobreposição, caso o sequenciamento tenha sido *pair-end*), agrupar sequências semelhantes com base num limiar de identidade (frequentemente 97% para o gene 16S rRNA) e finalmente atribuir a cada conjunto de sequências uma “Unidade Taxonômica Operacional” (OTU).

Diversas ferramentas off-line podem ser utilizadas nas análises *upstream* antes da obtenção da OTU *table* em estudos *metabarcoding*, contudo, ferramentas on-line *user-friendly* (*push-of-a-button*) também podem ser utilizadas nesta tarefa e ainda oferecem as vantagens da comodidade e de não se precisar de computadores altamente configurados. Por estes motivos, estas últimas ferramentas vêm se popularizando muito entre os usuários não

especialistas em bioinformática ou então que entre aqueles que possuem recursos de software ou hardware limitados (DUDHAGARA et al., 2015).

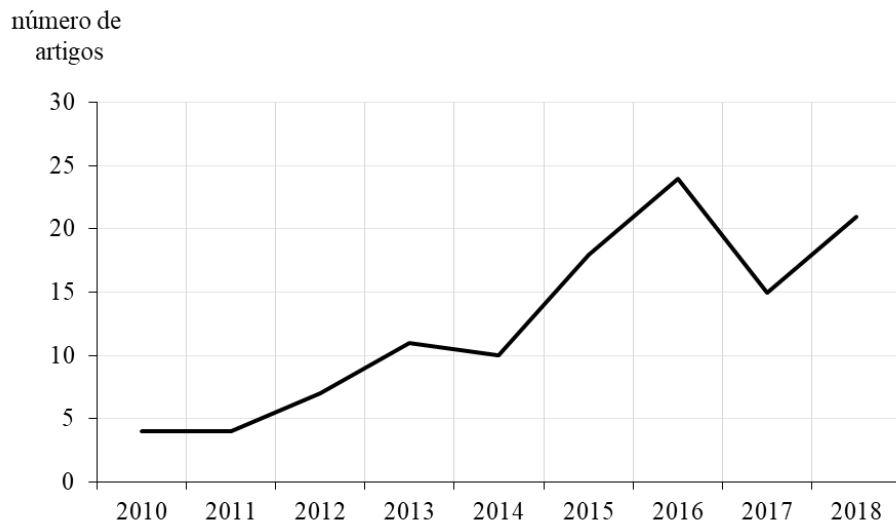
Tabela 01- Principais ferramentas on-line utilizadas para estudos metabarcoding.

Nome	Weblink
MG-RAST	<a href="https://metagenomics.anl.gov/">https://metagenomics.anl.gov/</a>
IMG / M	<a href="http://img.jgi.doe.gov/m">http://img.jgi.doe.gov/m</a>
METAREP	<a href="http://jcvl.org/metarep/">http://jcvl.org/metarep/</a>
Cometa	<a href="http://comet.gobics.de/">http://comet.gobics.de/</a>
METAGENassist	<a href="http://www.metagenassist.ca/METAGENassist/">http://www.metagenassist.ca/METAGENassist/</a>
MetaABC	<a href="http://metaabc.iis.sinica.edu.tw/">http://metaabc.iis.sinica.edu.tw/</a>
MyTaxa	<a href="http://enve-omics.ce.gatech.edu/mytaxa/">http://enve-omics.ce.gatech.edu/mytaxa/</a>
metaMicrobesOnline	<a href="http://meta.microbesonline.org/">http://meta.microbesonline.org/</a>
Metagenômica EBI	<a href="https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/">https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/</a>
CÂMERA	<a href="http://camera.calit2.net/">http://camera.calit2.net/</a>
METAVIR	<a href="http://metavir-meb.univ-bpclermont.fr/">http://metavir-meb.univ-bpclermont.fr/</a>
Virom	<a href="http://virome.dbi.udel.edu/">http://virome.dbi.udel.edu/</a>

Adaptado de Dudhagara e colaboradores (2015)

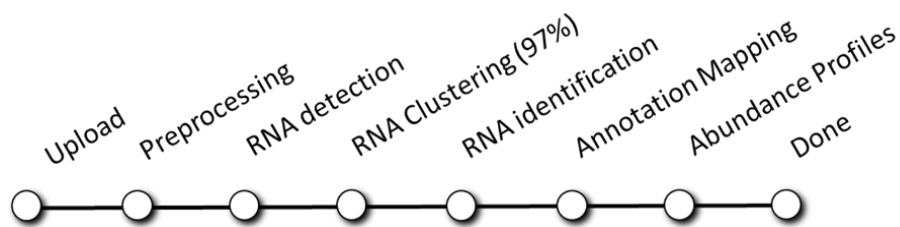
Entre as ferramentas apresentadas na Tabela 01, o MG-RAST é uma das mais utilizadas. Confirma esta afirmação, o fato de que nos últimos nove anos, de acordo com a base de dados PUBMED (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 115 trabalhos utilizaram o MG-RAST no seu *workflow* [Figura 06 (nesta figura é possível perceber adicionalmente que existe uma tendência ascendente de utilização desta ferramenta em trabalhos científicos)]. Dudhagara e colaboradores (2015) atribuem estes bons resultados a boa usabilidade, a *pipeline* simples (Figura 07) e a geração de várias análises de dados úteis, descritas pelos autores como fatores que corroboram para que este servidor *online* seja e continue popular e muito utilizado.

Figura 06 - Citação do MG-RAST no Pubmed no período entre 2009 e 2019.



Fonte: PUBMED (2019)

Figura 07 – Pipeline de análise *upstream* antes da obtenção da OTU table realizada pela ferramenta online *Metagenomic Analysis Server* – MG-RAST.



Adaptado de Wilke et al., 2016

No MG-RAST inicialmente os arquivos fastq são trimados utilizando o *Dynamic Trim* (COX; PETERSON; BIGGS, 2010) para remover as sequências com baixa qualidade (sequências com 5 bases abaixo da pontuação 15 phred) e também as leituras que desviem mais que dois desvios padrão da distância dos comprimento médio das sequências. Em seguida, sequências específicas de *Homo sapiens* são removidas utilizando Bowtie (LANGMEAD et al., 2009) e posteriormente, as sequências identificadas como rRNAs ribossômicos são agrupadas por identidade (97%) utilizando o algoritmo cdHIT (FU et al., 2012). As sequências mais longas, são selecionadas como representantes dos seus *clusters* e submetidas a uma pesquisa por similaridade contra o banco de dados M5rna, com o auxílio do algoritmo BLAT (KENT, 2002). Os dados obtidos são então integrados e expressos por

abundância que representa uma versão dinâmica de agrupamentos dos arquivos de similaridade.

- Análises *downstream* depois da obtenção da OTU *table*

Assim como as análises *upstream* antes da obtenção da OTU *table*, as análises *downstream* depois da obtenção da OTU *table*, também podem ser realizadas de maneira on-line (Tabela 02) e off-line (Tabela 03). Neste último caso, a linguagem de programação R é amplamente utilizada devido à grande oferta de pacotes gratuitos que possui e disponibiliza para todos os interessados em utilizá-las (ODINTSOVA; TYAKHT; ALEXEEV, 2017).

Tabela 02 – Servidores online mais populares para análises *downstream* após a obtenção da OTU *table* de acordo com as ferramentas que possuem.

<i>Tools</i>	<i>Microbiome-Analyst</i>	<i>METAGEN-assist</i>	<i>EBI-Metagenomics</i>	<i>MG-RAST</i>	<i>VAMPS</i>
<i>Registration</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>
<i>Data Processing</i>					
<i>Input</i>	<i>Count tables; BIOM; mothur output</i>	<i>Count tables; BIOM; outputs from 4 tools</i>	<i>Sequences</i>	<i>Sequences</i>	<i>Sequences</i>
<i>Filtering</i>	<i>Abundance, variance, manual</i>	<i>Abundance, variance</i>	–	<i>Abundance</i>	<i>Abundance</i>
<i>Normalization</i>	<i>Scaling, transformation, rarefying</i>	<i>Scaling, transformation</i>	–	<i>Scaling, transformation</i>	<i>Scaling</i>
<i>Taxonomic Profiling</i>					
<i>Alpha-diversity</i>	<i>Multiple</i>	–	–	<i>Shannon</i>	<i>Multiple</i>
<i>Beta-diversity</i>	<i>PCoA &amp; NMDS (2D &amp; 3D)</i>	<i>PCA, PLS-DA</i>	<i>PCA</i>	<i>PCoA</i>	<i>PCoA &amp; NMDS (2D only)</i>
<i>Functional profiling</i>					
<i>Functional prediction</i>	<i>PICRUSt &amp; Tax4Fun</i>	–	–	–	–
<i>Functional annotation</i>	<i>COG &amp; KEGG</i>	–	<i>GO</i>	<i>SEED, KEGG COG, eggNOG</i>	–
<i>Pathway visualization</i>	<i>Yes (JavaScript)</i>	–	–	<i>Yes (SVG)</i>	–
<i>Comparative analysis</i>					
<i>Differential analysis</i>	<i>Univariate methods, DESeq2, edgeR, metagenomeSeq</i>	<i>Univariate methods</i>	–	–	–
<i>Biomarker discovery &amp; classification</i>	<i>LEfSe, Random Forests</i>	<i>SVM, Random Forests</i>	–	–	–
<i>Meta-analysis</i>					
<i>Taxon set enrichment analysis</i>	<i>105 strain sets, 174 species sets, 42 others</i>	–	–	–	–
<i>Integration with public data</i>	<i>Visual analytics with 3D PCoA</i>	–	–	–	–

Fonte: Dhariwal e colaboradores (2017)

As ferramentas on-line citadas na Tabela 2 encontram-se disponíveis em:

<http://www.microbiomeanalyst.ca/> (MicrobiomeAnalyst)

<http://www.metagenassist.ca/> (METAGENassist)

<https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/> (EBI-Metagenomics)

<http://metagenomics.anl.gov/> (MG-RAST)

<https://vamps2.mbl.edu/> (VAMPS)

Tabela 03 – Pacotes R especificamente destinados à análise metagenômica/metabarcoding comumente utilizados para: comparação de dois ou mais grupos (ALDEx2), abordagens avançadas baseadas em modelos lineares generalizados que permitem a análise de fatores contínuos e discretos (metagenomeSeq, edgeR, DESeq2) e os métodos para comparação de vetores (HMP, vegan).

Pacotes	Testes estatísticos	
ALDEx2	Wilcoxon, Welch and Kruskal–Wallis tests, ANOVA	GLOOR, 2017
metagenomeSeq	<i>Generalized linear model</i>	PAULSON; POP; BRAVO, 2013
edgeR	<i>Generalized linear model</i>	ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010
DESeq2	<i>Generalized linear model</i>	LOVE; HUBER; ANDERS, 2014
HMP	<i>Generalized Wald-type statistics</i>	LA ROSA et al., 2012
vegan	PERMANOVA, ANOSIM	OKSANEN et al., 2013

Adaptado de Odintsova; Tyakht; Alexeev (2017)

### I - Análises Composicionais

Análises da composição de comunidades bacterianas podem ser qualitativas, quando se examinam apenas a presença de dados, ou quantitativas, quando também se leva em consideração a quantidade de cada um dos dados. A análise da comunidade *core* (bactérias presente em todas as amostras) pode ser considerada uma análise qualitativa. As análises quantitativas também conhecidas como estruturais, incluem as análises como: a composição absoluta, a composição relativa e ainda o estudo das diferenças estatísticas entre as amostras (HAMADY; KNIGHT, 2009).

Esquemáticamente as análises da composição bacteriana podem ser representadas de várias formas, entre algumas delas estão: tabelas, gráficos de barra e empilhado, além de diagramas de *Venn*, *extended error bar plot* entre outros.

Usualmente, as análises composicionais são as primeiras análises *downstream* após a obtenção da OTU *table* a serem realizadas, uma vez que podem ajudar a direcionar ou redirecionar as análises posteriores.

## II - Análises de diversidade

Kim e colaboradores (2017) sugerem que a biodiversidade alfa pode ser definida como riqueza (número de espécies presentes) e abundância relativa de espécies (dominância e equabilidade). Diversos índices são utilizados para avaliar a biodiversidade bacteriana em estudos *metabarcoding*, contudo, Chao1 (CHAO et al., 1984), Simpson (SIMPSOM et al., 1949) e Shannon (SHANNON; WETEHER, 1949) são os índices geralmente mais utilizados, pois, são considerados os índices de biodiversidade mais robustos (Kim et al, 2017) e são descritos na Tabela 04.

Tabela 04 – Índices de biodiversidade mais utilizados.

Índice	Descrição	Fórmula
Shannon	Índice relacionado a abundância relativa que atribui <u>maior peso a equabilidade</u>	$H = - \sum_{i=1}^s (p_i \ln p_i)$ <p>Onde: s é o número de OTUs e p<sub>i</sub> é a proporção da comunidade representada pela OTU<sub>i</sub></p>
Simpson	Índice relacionado a abundância relativa que atribui <u>maior peso a dominância</u>	$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$ <p>Onde: s é o número total de espécies na comunidade e p<sub>i</sub> é a proporção da comunidade representada pela OTU<sub>i</sub></p>
Chao1	Índice relacionado a riqueza	$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{Obs}} + \frac{F_1 (F_1 - 1)}{2 (F_2 + 1)}$ <p>Onde: F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> são as contagens de <i>singletons</i> e <i>doubletons</i> respectivamente e S<sub>obs</sub> o número de espécies observadas</p>

Adaptado de Kim e colaboradores (2017)

Com valores típicos entre 1,5 e 3,5 na maioria dos estudos ecológicos, o índice de Shannon aumenta à medida que a riqueza e a uniformidade da comunidade aumentam. Já o índice de Simpson (D) é uma medida de dominância que aumenta à medida em que a diversidade diminui (KIM et al., 2017).

Já a diversidade beta se relaciona a variação na composição de espécies entre as unidades de amostragem. Entre as medidas de diversidade beta, existem as que dependem e as que não dependem da diversidade alfa e gama, sendo então, aquelas baseadas na

dissimilaridade, provavelmente as mais comumente utilizadas neste último caso (RICOTTA, 2017).

### III - Análises de correlação

O coeficiente de correlação linear de Pearson descrito abaixo, [r (equação 1)] varia entre 1 e -1 e mede a associação entre duas variáveis (X e Y) pelo compartilhamento de suas variâncias (FIGUEIREDO-FILHO; SILVA-JÚNIOR, 2009).

Equação 1 – Coeficiente de correlação linear de Person (r)

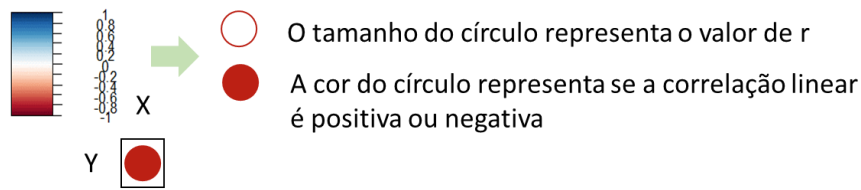
$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2)(\sum(y_i - \bar{y})^2)}}$$

De acordo com Dancey e Reidy (2013) os valores de r podem ser interpretados da seguinte forma:

- Quando r se aproxima de 1, o valor de uma variável aumenta quando a outra também aumenta, ou seja, há uma relação linear positiva.
- Quando r se aproxima de -1, também é possível dizer que as variáveis são correlacionadas, mas nesse caso quando o valor de uma variável aumenta o da outra diminui. Isso é o que é chamado de correlação negativa ou inversa.
- r = 0,10/-0,10 até 0,30/-0,30 -> fraco;
- r = 0,40/-0,40 até 0,60/-0,60 -> moderado;
- r = 0,70/-0,70 até 1/-1 -> forte.

Uma outra forma de se apresentar os resultados obtidos a partir de uma análise de correlação é um correlograma que nada mais é que uma representação gráfica de uma matriz de correlação. A Figura 08 apresenta esquematicamente um correlograma produzido pelo pacote corplot do ambiente R (WEI et al., 2017).

Figura 08 – Como interpretar um correlograma do pacote corplot do R (WEI et al., 2017).



Fonte: O próprio autor

#### IV - Análises funcionais

Historicamente o gene 16S rRNA vêm sendo utilizado em análises taxonômicas e filogenéticas, no entanto, atualmente ele também pode ser utilizados em predições funcionais através da construção dos perfis metagenômicos preditivos (PMPs). Desta forma, estudos *metabarcoding* com gene 16S rRNA que utilizam PMPs podem ser considerados um ponto de partida econômico e lógico que contribuem com a elaboração de novos *insights* e hipóteses que podem inclusive redirecionar o delineamento experimental de projetos futuros; contribuindo para que estas ferramentas sejam utilizadas com esta finalidade, assim como o pacote do ambiente R - Tax4fun (AßHAUER et al., 2015) se consolidem como novas opções de complementação de estudos sobre comunidades bacterianas investigadas a partir de sequenciamentos do gene 16S rRNA, independentemente do local de obtenção das amostras.

#### 2.6 - Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG)

As amostras analisadas por este trabalho foram obtidas do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) que se localiza na região norte do Estado do Paraná, no município de Londrina (Figura 09).

Figura 09 - Localização do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).



Fonte: Google Maps, 2018 e Mellati; Archela, 2014

A seguir é apresentado a ficha técnica do PEMG (Tabela 05), onde são fornecidas algumas informações sobre esta Unidade de Conservação.

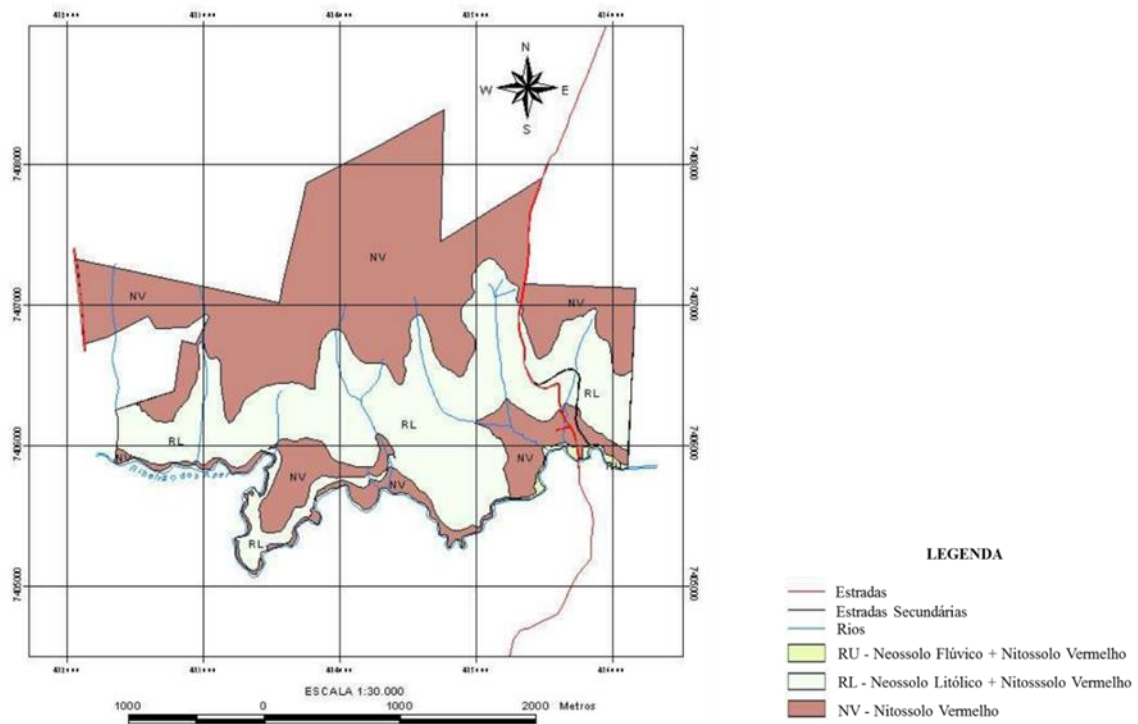
Tabela 05 – Ficha técnica do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

Unidade Gestora	Instituto Ambiental do Paraná - IAP
Endereço da Sede	Fazenda Três Bocas, Município de Londrina/PR
Superfície (ha)	675,70 + 14,4756 = 690,1756
Perímetro (m)	18.552,72
Município	Londrina
Estado	Paraná
Coordenadas Geográficas do Centro da UC	23° 27' latitude S; 51° 15' longitude W
Decreto de Criação	Decreto Estadual nº 5.150, de 05 de junho de 1989
Alterações Posteriores	Decreto Estadual nº 3.917, de 30 de dezembro de 1997
Limites	Sul: Ribeirão dos Apertados Norte: propriedades particulares Leste: propriedades particulares Oeste: propriedades particulares
Bioma e Ecossistemas	Floresta Estacional Semidecidual (Floresta Subtropical Latifoliada)
Atividades Desenvolvidas	Educação Ambiental, Fiscalização e Pesquisa
Atividades Conflitantes	Caça
Atividades de Uso Público	Educação Ambiental: visitação de escolas (2ª a 6ª feira) e visitação pública (domingo no período da tarde).

### 2.6.1.1 - Informações adicionais

O PEMG é composto predominantemente por Nitossolos Vermelho (NV – Figura 10), contudo em algumas planícies inundadas estes solos se associam com argila e formam os Neossolo Flúvico (NV – Figura 10). Enquanto que os solos provenientes dos afloramentos rochosos de basalto que terminam no fundo do vale do córrego Apertados são classificados como Neossolos Litólico (NL – Figura 10) (IAP 2002). As amostras coletadas para este trabalho foram realizadas em áreas com Neossolos Vermelhos internacionalmente conhecidos como *Rhodic Ferralsol* (FAO, 1994).

Figura 10 - Mapa de Solos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).



SÍMBOLO	CLASSE DO SOLO
RU	NEOSSOLO FLÚVICO Eutrófico típico, A moderado, fase Floresta Estacional Semidecidual Aluvial, relevo plano, substrato sedimentos holocênicos indiscriminados.
RL	NEOSSOLO LITÓLICO Eutrófico típico, A proeminente, fase Floresta Estacional Semidecidual, relevo ondulado a forte ondulado, substrato rochas eruptivas básicas.
NV	NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico latossólico, A moderado, fase Floresta Estacional Semidecidual, relevo suave ondulado a ondulado, substrato rochas eruptivas básicas.

A floresta existente no PEMG é um dos últimos remanescentes de Floresta Subtropical (Floresta Estacional Semidecidual), que anteriormente cobria grande parte do Estado do Paraná e estendia-se até o Paraguai e Argentina. Atualmente este remanescente está circundado por áreas ocupadas pela agropecuária (IAP, 2002).

Quanto a composição florestal, o PEMG de acordo com Bianchini e colaboradores (2001) apresenta um estrato superior denso, com dominância de espécies como *Cabrlea canjerana* (Meliaceae) e *Euterpe edulis* (Arecaceae), e um estrato emergente composta especialmente por *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae) e *Sloanea monosperma* (Elaeocarpaceae). Os estratos inferior e médio são mais rarefeitos, pouco iluminados e compostos por arbustos esparsos e dominados por algumas árvores de pequeno porte, como *Eugenia verrucosa* (Myrtaceae) e *Sorocea bonplandii* (Moraceae) (Figura 11).

Figura 11 - Perfil esquemático destacando a estrutura de um segmento de uma Floresta Estacional Semidecidual.



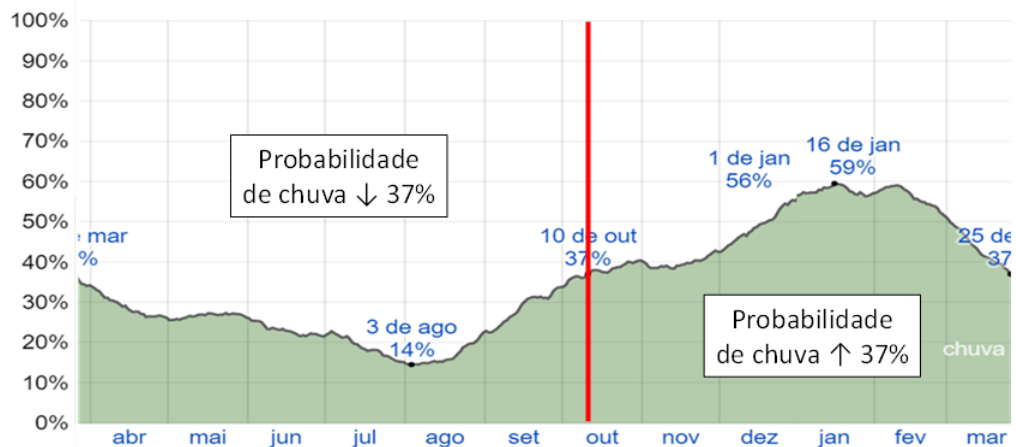
Roderjan et al., 2002

Já o clima de acordo com a classificação de Köppen é subtropical úmido (Cfa), com temperatura média anual de 20°C e a precipitação cerca de 900mm (INMET, 2018).

Uma outra característica ambiental que merece destaque é a precipitação pluviométrica. Bianchini e colaboradores (2003) sugeriram que a cidade de Londrina (PR) possui duas estações bem definidas quanto à precipitação. Informações coletadas pela estação meteorológica do Aeroporto Governador José Richa (Londrina – PR), concordam com esta afirmação (Figura 12) e ainda adicionam que a período com a maior precipitação pluviométrica dura 5,5 meses (10 de outubro a 25 de março) e possui uma probabilidade de precipitação acima de 37%, enquanto que o período seco dura 6,5 meses (25 de março a 10 de

outubro) e a probabilidade de um dia com precipitação é menor que 37% (Weather Spark, 2018), confirmando assim a afirmação realizada por Bianchini e colaboradores (2003).

Figura 12 – Porcentagem de dias com precipitações pluviométricas mínimas de 1 milímetro.



Fonte: Adaptado a partir de Weather Spark, 2018

Adicionalmente, Pimenta e colaboradores (2011) em seu estudo sobre a deposição da serapilheira no PEMG, observaram que a precipitação pluviométrica é um dos principais fatores que influenciam a deposição da serapilheira, sendo que os valores máximos de deposição aconteceram no final do período seco (setembro e outubro) e os valores mínimos aconteceram no final do período com maior precipitação (março e abril). Desta forma, o início da estação seca e o início da estação com a maior precipitação pluviométrica, foram os dois momentos selecionados por este estudo para a realização da coleta de amostras.

### 2.6.1 - Estudos microbiológicos no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG)

Apesar da grande importância que possuem os microrganismos não são um tema recorrente entre as pesquisas desenvolvidas no PEMG. Nos últimos 10 anos, dos 98 trabalhos científicos desenvolvidos no PEMG (IAP, 2018), apenas 2 envolviam diretamente a temática microrganismos e somente Zangaro e colaboradores, (2013) disponibilizaram os resultados que obtiveram através da publicação do artigo científico intitulado *Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil*; onde descrevem e identificam com base na morfologia dos esporos, fungos micorrízicos arbusculares. Ainda neste trabalho, os autores

salientam que o investimento que as plantas fazem nesta relação mutualística, decresce com os estágios tardios de sucessão florestal e puderam observar que o potencial do inóculo de fungos micorrízicos arbusculares foi reduzido no PEMG. Desta forma, além de trabalharem com um grupo restrito de fungos, o estudo demonstrou que a diversidade encontrada foi diminuída pelo estágio avançado de sucessão do conjunto florestal do PEMG e apesar de poder ser considerada uma primeira aproximação sobre a tarefa de inventariar como é composta a comunidade de microbiana no PEMG, esta tarefa ainda não foi concluída e poderá contar com a metodologia *metabarcoding* de 16S rRNA como uma ferramenta muito útil para a realização deste trabalho.

### 3 - OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

- Estudar as comunidades bacterianas presentes em amostras de solo/serapilheira obtidas a partir de um conjunto florestal pertencente ao bioma Mata Atlântica.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises *upstream* antes da obtenção de *OTU table*;
- Analisar a composição das comunidades bacterianas;
- Investigar a diversidade alfa e beta;
- Estudar as relações de correlação entre os principais filos bacterianos encontrados e os metadados;
- Realizar previsões funcionais e pesquisar sobre suas especificidades;
- Testar *in vitro* previsões realizadas *in silico*.

Este manuscrito foi submetido ao periódico  
GENETICS and MOLECULAR BIOLOGY

**Análises taxonômico-metabólicas conduzidas a partir do solo/serapilheira de uma floresta estacional semidecidual subtropical pertencente ao bioma Mata Atlântica**

Gilberto de Aguiar Pereira<sup>1</sup>, Gisele Maria de Andrade de Nobrega<sup>1</sup>; Fernando Gomes Barcellos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina - Londrina - PR, Brasil

**Título curto:** Metabarcoding de floresta subtropical

**Palavras-chave:** Celulose, predição funcional, glicosidases, metabarcodings, análise taxonômica

**Autor correspondente:** Fernando Gomes Barcellos

+55 (43) 3371-4207

fernando.barcellos@uel.br

Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, S/N - Campus Universitário, Londrina - PR, Brasil

Zip code: 86057-970

## 1 **RESUMO**

2

3 O solo/serapilheira de florestas estacionais semidecíduais subtropicais são locais privilegiados  
4 para o desenvolvimento de investigações sobre as comunidades bacterianas. Contudo, estudos  
5 sobre esta temática nestes locais, tem sido pouco realizados. Por este motivo, o objetivo deste  
6 trabalho foi estudar comunidades bacterianas presentes em amostras de solo/serapilheira  
7 obtidas a partir de uma floresta estacional semidecidual subtropical pertencente ao bioma  
8 Mata Atlântica, localizada no sul do Brasil. Para isso, análises químicas do solo, testes  
9 enzimáticos e ainda análises de composição, diversidade, correlação e predição foram  
10 realizadas a partir de sequenciamentos do gene 16S rRNA. Assim, obteve-se como resultado  
11 que existe um padrão de ocorrência de filos bacterianos nos solos/serapilheiras florestais e que  
12 o padrão de correlação destes filos com os fatores ambientais possivelmente é característico  
13 para cada local especificamente. Além disso, constataram-se que predições funcionais foram  
14 confirmadas por experimentos *in vitro* e isso demonstrou que o *workflow user-friendly*  
15 utilizado neste trabalho pode vir a se tornar uma alternativa para complementar os estudos  
16 taxonômicos realizados a partir de sequenciamentos do gene 16S rRNA.

17

18

19

20

21

22

23

## 24 INTRODUÇÃO

25

26 A ecorregião Florestas Alto Paraná (pertencente ao bioma Mata Atlântica) (DI  
27 BITETTI; PLACCI; DIETZ, 2003) é composta predominantemente por florestas estacionais  
28 semidecíduais que perdem entre 20 a 50% das folhas na estação com menor incidência de  
29 chuvas. Assim, todo este material vegetal que é depositado sobre o solo, acaba  
30 disponibilizando para os microrganismos vários nutrientes e *microhabitats*, tornando estes  
31 locais ambientes privilegiados para o desenvolvimento e estudos sobre os microrganismos  
32 (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015).

33 Neste sentido, no solo/serapilheira florestal os fungos inicialmente são os  
34 microrganismos presentes em maior número, no entanto, a biodiversidade e a biomassa de  
35 bactérias aumenta muito durante o processo de decomposição (VOŘÍŠKOVÁ; BALDRIAN,  
36 2013; TLÁSKAL; VOŘÍŠKOVÁ; BALDRIAN, 2016;), isso acontece porque a composição  
37 química da serapilheira se torna diferente à medida em que a decomposição progride e as suas  
38 várias camadas acabam por disponibilizar aos microrganismos diferentes substratos  
39 (ŠNAJDR, et al., 2011). Além disso, a comunidade microbiana ainda é influenciada pelas  
40 árvores, suas rizosferas (URBANOVA; ŠNAJDR; BALDRIAN, 2015) e também pela  
41 sazonalidade, já que, a temperatura e a quantidade de radiação solar influenciam a  
42 disponibilização dos fotossintatos que são importantes fonte de nutrientes para os  
43 microrganismos (BALDRIAN, 2017). Já nos solos a granel, as comunidades microbianas  
44 também são afetadas pela identidade das árvores e pelo efeito delas sobre a composição  
45 química do solo (TEDERSOO et al., 2016). Variações em parâmetros como umidade, pH,  
46 teor de matéria orgânica e variações nas condições climáticas também são responsáveis pela  
47 geração de *hotspots* que afetam a composição da comunidade microbiana a medida em que  
48 criam condições únicas para o desenvolvimento dos microrganismos (KUZYAKOV;  
49 BLAGODATSKAYA, 2015). Todos os fatores anteriormente citados, acompanhados ainda

50 dos fatores estocásticos, contribuem para a variabilidade microbiana entre e dentro dos  
51 ecossistemas florestais.

52         Desta forma, mesmo diante das inúmeras possibilidades de criações de habitats  
53 microbianos que podem ser observados e estudados nas mais diversas formações vegetais  
54 existentes no mundo, o estudo sobre a ocorrência de bactérias presentes no solo/serapilheira  
55 florestal, é predominantemente realizado nas regiões boreais e temperadas e as florestas  
56 tropicais e subtropicais são pouco estudadas sob esta perspectiva (BANI et al., 2018). Por  
57 isso, faz-se necessário que estudos sobre estes ambientes sejam celeremente e amplamente  
58 realizados.

59         Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi estudar as comunidades bacterianas  
60 presentes em amostras do solo/serapilheira obtidas a partir de um conjunto florestal  
61 pertencente ao bioma Mata Atlântica.

62

## 63 **METODOLOGIA**

64

### 65 Coleta do solo/serapilheira

66

67         O local selecionado para a realização deste estudo foi o Parque Estadual Mata dos  
68 Godoy (PEMG) que se localiza na cidade de Londrina e que pertence a região sul do Brasil  
69 (Figura 1).

70         O solo do PEMG é classificado como um *Rhodic Ferralsol* (FAO, 1994). Já o clima é  
71 considerado subtropical úmido mesotérmico (*Cfa*) com temperatura média anual de 20 °C e  
72 900 mm de precipitação anual total (INMET, 2018) e a vegetação do PEMG pertence ao  
73 bioma Mata Atlântica, sendo classificada como uma floresta subtropical semidecidual  
74 primária.

75 Os meses de abril e outubro foram os selecionados para a realização das coletas, pois  
76 historicamente são os meses após os períodos com a maior e menor pluviosidade  
77 respectivamente (INMET, 2018). No momento da coleta, as amostras de solo/serapilheira  
78 foram obtidas de forma superficial ( $\pm 2$  cm), próximas a locais com presença de fungos  
79 macroscópicos com o auxílio de um cilindro de aço estéril (autoclavado) de acordo com o  
80 sugerido por Belanger e Van Rees (2008).

81 Após a coleta, todo o material obtido foi acondicionado em sacos plásticos com fecho  
82 tipo *ziplock*, e em seguida, foram transportados até o Laboratório de Genética de  
83 Microrganismos (LAGEM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em uma caixa  
84 térmica de isopor com gelo até a realização das análises química e a extração de DNA do  
85 solo.

86

87 Análises químicas e extração de DNA a partir do solo

88

89 A análise química do solo foi realizada de acordo com Babujia e colaboradores (2010)  
90 e a extração do DNA foi realizada utilizando *PowerMax Soil DNA Isolation Kit* (MO BIO  
91 Laboratories) seguindo as recomendações do fabricante.

92

93 Sequenciamento Illumina

94

95 Inicialmente foi realizada uma PCR para amplificação geral da região V3 e V4 do  
96 gene 16S rRNA (PCR1). Os oligos utilizados nesta reação incluíram a sequência de índice  
97 duplo necessária para a multiplexação. Uma segunda reação de PCR (PCR2) foi realizada  
98 usando cada conjunto de amplicon como molde. A PCR1 foi realizada a partir das seguintes  
99 condições: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C para 45s, 55 °C para 30s e 72 °C para 45s e

100 uma extensão final de 72 ° C durante 2 min. Já a PCR 2, utilizou: 95 °C por 5 min, 10 ciclos  
101 de 95 °C por 45s, 66 °C por 30s e 72 durante 45 s e uma extensão final de 72 durante 2 min.  
102 A reação de PCR2 foi purificada utilizando o kit AMPureXP (Beckman Coulter, Brea, CA) e  
103 as amostras foram então agrupadas em bibliotecas de sequenciamento e quantificadas por  
104 qPCR usando o Kit KAPA de Quantificação para plataformas Illumina (KAPA Biosystems,  
105 Woburn, MA). Assim, as bibliotecas já ajustadas, foram sequenciadas em um sistema MiSeq,  
106 utilizando recomendações do fabricante.

107

### 108 *Análises Upstream*

109

110 Os arquivos fastq obtidos através do sequenciamento foram submetidos ao pipeline de  
111 análise do *Metagenomic Analysis Server* (MG-RAST) do *Argonne National Laboratory*  
112 (WILKE et al., 2016).

113 Adicionalmente é preciso salientar que todos os resultados obtidos podem ser  
114 acessados através do portal: <https://www.mg-rast.org> e dos números de acesso mgs681644,  
115 mgs681647, mgs681650, mgs632034, mgs632031 e mgs645379.

116

### 117 *Análises Downstream*

118

119 As análises estatísticas dos dados foram conduzidas a partir da tabela de metadados e  
120 da *OTU table* no ambiente R 3.5.1 (R Development Core Team), utilizando inicialmente o  
121 pacote Vegan (OKSANEN et al., 2013) para se estudar a diversidade alfa (através dos  
122 cálculos dos índices de Shannon, Simpson e Chao1), a diversidade beta (através do cálculo da  
123 diferença na homogeneidade dos grupos com aplicação do teste de permutação), análise de  
124 agrupamento (através da clusterização hierárquica aglomerativa – vizinho mais próximo) e

125 ordenação multivariada (através das análises de correspondência canônica e análise da  
126 similaridade percentual). Adicionalmente utilizou-se o pacote Corrplot (WEI et al., 2017) para  
127 as análises de correlação (através do cálculo do coeficiente de correlação de Person).

128 Já o servidor METAGENassist foi utilizado para que acessar as capacidades  
129 funcionais dos microrganismos através do mapeamento taxonômico funcional automatizado  
130 (ARNDT et al., 2012) e o pacote do Tax4fun do R (AßHAUER et al., 2015) foi utilizado para  
131 que se construíssem os perfis metabólicos metagenômicos (PMM).

132 Análises estatísticas adicionais foram conduzidas utilizando o software STAMP  
133 (PARKS et al., 2014).

134

135 Ensaio enzimático

136

137 Uma parcela das amostras do solo/serapilheira (1 g) coletadas durante os meses de  
138 abril e outubro foram incubadas com e sem a utilização do antifúngico benomil ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ )  
139 em erlenmeyers com 25 mL de tampão citrato 0.05M, pH 4,8 em um banho-maria sob  
140 agitação constante por 18 h ( $40^\circ\text{C}$  e 120 rpm). Em seguida, o sobrenadante desta suspensão,  
141 obtido por centrifugação (5000 RCF, 10 min e  $4^\circ\text{C}$ ) foi utilizado para quantificar as proteínas  
142 de acordo com Bradford (1976) e a atividade da enzima exoglucanase (cellulose-1,4- $\beta$ -  
143 cellobiases EC 3.2.1.91) de acordo com Mandels e colaboradores (1976).

144 Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e os resultados expressos  
145 em Unidades por mg de proteína (U/mg), onde cada U foi definida como a quantidade de  
146 enzima que é necessária para catalisar a liberação de um  $\mu\text{mol}$  de glicose  $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ .

147

## 148 **RESULTADOS**

149

150 Amostragem

151

152 Neste trabalho, 267.819.585 pb foram (Tabela suplementar 1). As análises *upstream*,  
153 indicaram que 62,86% dos *reads* relacionados as amostras coletadas em abril e 42,87% das  
154 amostras coletadas em outubro receberam atribuições de OTUs.

155

156 Análises Taxonômicas

157

158 *Composição*

159

160 A partir de todas as OTUs atribuídas anteriormente, 26 diferentes filos bacterianos  
161 foram identificados no total, entre eles 21 estavam presentes nas duas condições estudadas  
162 (comunidade *core*) enquanto que os outros cinco (comunidade *noncore*) estavam presentes  
163 somente em amostras coletadas em abril (Figura 2A e 2B).

164 Proteobacteria (32,98%), Actinobacteria (19,41%) e Firmicute (13,21%) foram os filos  
165 mais abundantes em amostras coletadas em outubro. Já em abril, os filos mais abundantes  
166 foram: Proteobacteria (26,81%), Actinobacteria (16,34%) e Bacteroidete (15,52%).  
167 Comparando numericamente as duas condições, dois dos três filos mais abundantes, estavam  
168 presentes nas duas condições e somente um não estava (Figura 2B). Sob o ponto de vista  
169 estatístico (*G+Fisher test*), a Figura 2C apresenta os quatro principais filos classificados de  
170 acordo com o *effect sizes* que apresentaram diferença estatisticamente significativa (intervalo  
171 de confiança 95%). Através desta mesma análise é possível constatar que as maiores  
172 diferenças encontradas entre as duas condições, se referem ao filos numericamente mais  
173 presentes que inclusive já foram citados anteriormente neste mesmo tópico.

174

175 *Diversidade  $\alpha$  e  $\beta$*

176

177 De acordo com os índices de Chao1 e Shannon, as comunidades bacterianas obtidas a  
178 partir de amostras coletadas em abril puderam ser consideradas mais ricas e diversas que as  
179 amostras coletadas em outubro. Contudo, de acordo com o índice de Simpson as estimativas  
180 de dominância foram semelhantes (Tabela 1).

181 Já as análises de agrupamento baseadas em dissimilaridades, apesar de não  
182 apresentarem diferenças estatísticas significativas, revelaram que as amostras MGA1, MGA2  
183 e MGA3 coletadas em abril são mais próximas entre si do que das amostras MGO4, MGO5 e  
184 MGO6 coletadas em outubro. O mesmo acontece com as amostras coletadas em outubro em  
185 relação a si mesmas (Figura 3A). Já a análise de clusterização (Figura 3B) foi capaz ainda de  
186 mostrar que além do agrupamento inicial em dois grupos (*clusters*), cada um deles é composto  
187 por um *singleton* (MGA2 e MGO5) e um *cluster* com duas amostras (MGA1-MGA3 e  
188 MGO4-MGO6). Sendo então, MGO4 e MGO6 as amostras menos dissimilares e MGA1 e  
189 MGO6 as amostras mais dissimilares. Complementarmente é possível relacionar o *singleton*  
190 MGA2 com a menor amostragem numérica de indivíduos do seu cluster e o *singleton* MGO5  
191 com a maior amostragem do seu. Desta forma é possível demonstrar que as análises realizadas  
192 produziram agrupamentos efetivos no que se refere as replicatas biológicas e os períodos de  
193 coleta.

194

### 195 *Correlação*

196

197 Inicialmente é preciso destacar que existem dois padrões de resultados para os  
198 metadados (P1 e P2) (Tabela 2 e Figura 4) e que os filos: Aquificae, Bacteroidetes, Chlorobi,  
199 Deinococcus-Thermus, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Fusobacteria, Lentisphaerae e  
200 Tenericute se correlacionam fortemente de maneira positiva com o P1 ( $r > 0,7$  e  $p$ -value 0.05),

201 enquanto que os filos Deferribacteres e Thermotogae se correlacionam fortemente mais de  
202 maneira negativa a este padrão ( $r > -0,7$  e  $p\text{-value}$  0.05). Já os filos Actinobacteria,  
203 Gemmatimonadetes e Proteobacteria apresentam correlações fracas de maneira negativa com  
204 o P1 ( $r < -0,2$  e  $p\text{-value}$  0.05). É preciso salientar ainda que o P2 ocorre na direção oposta ao  
205 P1, então todos os padrões de correlação obtidos por esta análise se repetem de forma  
206 invertida no P2 (Figura 4). Um exemplo para esclarecer tal situação é o filo Tenericutes que  
207 apresenta uma forte correlação positiva com o P1 e negativa com o P2. Assim, a ocorrência  
208 deste filo se correlaciona positivamente com os maiores valores de pH, Al, MO, C, N, P, Ca,  
209 Mg, Zn e Fe (P1) encontrados nas amostras coletadas em abril e negativamente com os  
210 maiores valores de K, Cu, Mn e C:N (P2) encontrados nas amostras coletadas em outubro.  
211 Adicionalmente é preciso destacar que todos os filos pertencentes aos conjuntos forte e  
212 fracamente correlacionados com P1 e P2 se correlacionam fortemente entre si (Figura  
213 Suplementar 1).

214

#### 215 *Análises multivariadas*

216

217 Foi possível constatar através da Análise de Correspondência Canônica (CCA) que as  
218 amostras coletadas em abril e outubro são 10.71% dissimilares entre si e que 80.41% desse  
219 valor pode ser explicadas pelos fatores ambientais. Já os 19,59% não explicados pelos fatores  
220 ambientais foram analisados a partir da Análise de Similaridade Percentual (SIMPER) que  
221 revelou que 61,12% dele pode ser associado aos filos Proteobacteria, Bacteroidetes,  
222 Actinobacteria e Acidobacteria em conjunto (Figura Suplementar 2). Nove outros filos são  
223 responsáveis por 35,81%. Os outros 3,07% são associados a outros 13 filos; indicando assim  
224 que todos os filos identificados neste trabalho contribuem em maior ou menor proporção para  
225 a dissimilaridade entre as amostras.

226

227 Análises funcionais

228

229 *Mapeamento Taxonômico Funcional Automatizado*

230

231 As capacidades funcionais associadas aos microrganismos, foram inicialmente  
232 inferidas a partir das atribuições taxonômicas utilizando a ferramenta METAGENassist. Entre  
233 os diversas predições obtidas, o item metabolismo foi selecionado com o intuito de  
234 complementar as análises já realizadas. Desta forma, foram observados que as 15 principais  
235 atribuições fenotípicas recuperadas (predições  $\geq 0,1\%$ ) puderam ser relacionados aos ciclos  
236 biogeoquímicos do nitrogênio, enxofre e carbono, além do metabolismo de pesticidas e da  
237 produção do antibiótico estreptomicina (Tabela 3), representando desta forma, possivelmente,  
238 os eventos metabólicos mais importantes para a comunidade de microrganismos neste estudo.

239

240 *Correlação entre as atribuições fenotípicas obtidas a partir do Mapeamento Taxonômico*241 *Funcional Automatizado*

242

243 A análise de correlação entre as atribuições fenotípicas (AF) recuperadas a partir da  
244 análise anterior, indica que a maioria das AF se tratavam de interações positivas. Contudo, o  
245 mesmo não aconteceu com os itens: oxidação de sulfato, degradação de xilano, degradação de  
246 hidrocarbonetos aromáticos e *unknown* que, de acordo com o coeficiente de Person se  
247 correlacionam de forma positiva somente entre elas mesmas (Figura 5) e por este motivo, foi  
248 criada a hipótese que estas AFs estejam conectadas.

249

250 *Perfis Metabólicos Metagenômicos e Ensaio enzimático*

251

252 De acordo com as atribuições fenotípicas que apresentaram padrão de correlação  
253 diferente das demais na análise anterior, o item degradação do xilano foi a AF selecionada  
254 como ponto de partida para a realização de uma outra investigação funcional *in silico*  
255 (Tax4fun), pois foi a única AF relacionada ao metabolismo de um macronutriente.

256 Ao se investigar as enzimas que degradam xilano [glicosidases (EC 3.2.1.-)], foram  
257 observadas que 48 glicosidases foram preditas (Tabela suplementar 2), sendo que todas elas  
258 foram submetidas a análises estatísticas no software STAMP; que apontou , que duas delas,  
259 apresentavam predição diferencial ao nível de 95% de confiança (Figura suplementar 3) e por  
260 isto, elas se tornaram candidatas em potencial para a realização do teste enzimático *in vitro*.  
261 Entre as duas enzimas pré-selecionadas anteriormente, a enzima cellulose-1,4- $\beta$ -cellobiases  
262 (EC 3.2.1.91) foi a escolhida para a realização de ensaios *in vitro*, pois diferentemente da  
263 outra enzima ela não possui atividade antibacteriana amplamente reconhecida (PRIMO et al.,  
264 2018).

265 Desta forma, ao se realizar os experimentos relacionados as predições do Tax4fun,  
266 notou-se que caso se considerasse somente a utilização dos resultados onde se empregou o  
267 antifúngico, a predição foi acertada [(7.92 U/mg foi a atividade específica da enzima em abril  
268 e 5.78 U/mg em outubro (*p-value* = 0,042)]. É preciso destacar ainda, que a atividade  
269 específica da enzima cellulose-1,4- $\beta$ -cellobiases com a utilização de antifúngico em amostras  
270 coletadas em abril foi proporcionalmente maior do que a atividade desta mesma enzima em  
271 amostras coletadas em outubro (Figura 6), demonstrando assim que possivelmente exista uma  
272 participação mais efetiva dos fungos na produção desta enzima nesta condição, corroborando  
273 com a hipótese de que também no solo/serapilheira do PEMG independentemente da  
274 condição estudada, os fungos e bactérias atuam de forma colaborativa para a degradação dos  
275 compostos celulolíticos.

276

277 **DISCUSSÃO**

278

279 Análises Taxonômicas

280

281 *Padrão de ocorrência de filos bacterianos no solo/serapilheira*

282

283 Os resultados de composição para os filos mais abundantes encontrados por esta  
284 investigação (Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes ou Firmicute – dependendo do  
285 período de coleta das amostras) concordam com aquela obtida por Kim e colaboradores  
286 (2014) na serapilheira de florestas tropicais e temperadas na Malásia (Proteobacteria,  
287 Actinobacteria e Bacteroidetes) e também concordam com os resultados obtidos por Tláškal;  
288 Voříšková; Baldrian (2016) em uma serapilheira de uma floresta de carvalho na República  
289 Tcheca (Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria). Os resultados de composição para os  
290 filos mais abundantes encontrados por esta investigação também são similares aos  
291 encontrados por Faoro e colaboradores (2011) no solo da Mata Atlântica no Brasil  
292 (Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria) e Jeanbille e colaboradores (2016) no solo de  
293 uma floresta temperada na França (Proteobacteria, Acidobacteria e Bacteroidetes). Sendo  
294 assim, é possível perceber que existe um padrão de ocorrência semelhante entre os três  
295 primeiros filos encontrados neste e nos trabalhos citados nesta seção, especialmente aqueles  
296 que estudaram as serapilheiras florestais. Este acontecimento possivelmente está relacionado a  
297 seleção da comunidade bacteriana a partir dos substratos/ambiente presentes nos  
298 solos/serapilheira florestais a medida em que os microrganismos mais familiarizados com  
299 estes locais acabam se tornando os numericamente mais presentes (RINTA-KANTO et al.  
300 2016).

301

302 *Padrão de correlação entre os fatores ambientais e comunidades bacterianas*

303

304 No que se refere as análises de correlação, os resultados obtidos por esta investigação  
305 concordam em níveis variáveis com os resultados obtidos por outros trabalhos (FIERER;  
306 BRADFORD; JACKSON, 2007; HERMANS et al., 2016 e DELGADO-BAQUERIZO et al.,  
307 2016).

308 Hermans e colaboradores (2016) e Delgado-Baquerizo e colaboradores (2016)  
309 obtiveram resultados semelhantes ao que esta investigação obteve no que se refere a  
310 correlação positiva entre os filos bacterianos e o pH. Contudo, os resultados obtidos por este  
311 estudo concordam em parte com o Hermans e colaboradores (2016) no que se refere ao  
312 número de filos que se correlacionam positivamente com o aumento dos valores da relação  
313 C:N e com a correlação negativa entre a concentração de C e os filos Chroflexi e  
314 Actinobacteria apontada por Delgado-Baquerizo e colaboradores (2016). Além disso, ao  
315 contrário do que aconteceu nos experimentos realizados por Hermans e colaboradores (2016)  
316 esta investigação não constatou nenhuma correlação negativa entre o filo Bacteroidetes e o Al  
317 ou então a correlação positiva entre os filos Acidobacteria e Protebacteria com a concentração  
318 de C.

319 Sendo assim, é possível dizer que mesmo analisando fatores ambientais semelhantes e  
320 comunidades bacterianas de ambientes parecidos, o padrão de correlação parece ser específico  
321 para cada ambiente que pode conter microrganismos únicos ou então ecótipos de  
322 microrganismos mais adaptados a cada situação, sugerindo que a correlação exiba padrões  
323 característicos para cada ambiente, em específico.

324

325 *Fatores ambientais e comunidades bacterianas no solo/serapilheira do PEMG – Variações*  
326 *Sazonais*

327

328           Em se tratando do item composição, as maiores diferenças estatísticas encontradas  
329 entre as duas condições estudadas se referem ao filo Bacteroidetes que foi 8,71% mais  
330 abundante em amostras coletadas em abril e o filo Proteobacteria que foi 6,17% mais  
331 abundante em amostras coletadas em outubro. Possivelmente o filo Bacteroidetes apresenta  
332 maior abundância em amostras coletadas em abril porque abriga microrganismos que ajudam  
333 a degradar carbonos recalcitrantes como os presentes nos polímeros celulose e lignina  
334 (AISLABIE; DESLIPPE; DYMOND, 2013). Além disso, a abundância relativa dos  
335 microrganismos deste filo se correlacionam positivamente com a maior quantidade de N  
336 disponível (FIERER; BRADFORD; NEMERGUT et al., 2007), o que acaba concordando  
337 com as informações mostradas na Tabela 2, onde se pode observar que este macronutriente  
338 está numericamente mais disponível nas amostras de solo/serapilheira coletados em abril. Já  
339 as Proteobacterias são um grupo metabolicamente diverso que incluem entre eles bactérias r-  
340 estrategistas que crescem rapidamente a partir de diversos tipos de substrato e também  
341 bactérias k-estrategistas que direcionam mais recursos energéticos para a produção de  
342 enzimas (LLADÓ, LÓPEZ-MONDÉJAR, BALDRIAN, 2017), ampliando desta forma, as  
343 suas possibilidades de desenvolvimento. Além disso, bactérias deste filo, crescem mais  
344 rapidamente em resposta à deposição de lignina (DEANGELIS et al., 2011) e também porque  
345 podem obter C e N dos micélios fúngicos (BRABCOVÁ et al., 2016), condições mais  
346 relacionadas com as amostras coletadas em outubro (ZANGARO et al., 2013). Desta forma,  
347 estes processos e estratégias, possivelmente justifiquem ao menos em parte das diferenças  
348 encontradas na abundância relativa destas bactérias entre as duas condições pesquisadas.

349           No que se refere ao estudo da biodiversidade, os resultados obtidos por esta  
350 investigação corroboram com a hipótese de que a diversidade apresentada pelas comunidades  
351 microbianas possivelmente estejam associadas com os níveis de C e N das amostras de onde

352 foram obtidas (PALVIAINEN et al., 2010), já que nas amostras coletadas em outubro a  
353 disponibilidade de C foi muito menor do que nas amostras coletadas em abril. Estes mesmos  
354 autores, sugerem ainda que a disponibilidade do N nos solos florestais, se relaciona com a  
355 ligação ou não deste elemento aos grupos fenólicos, quinonas e carboidratos que se formam  
356 durante a degradação de compostos lignocelulolíticos. Os nossos resultados possivelmente  
357 também corroboram com esta sugestão, pois a menor disponibilidade de N encontradas em  
358 amostras coletadas em outubro possivelmente se relacione aos processos supracitados.

359 Já o agrupamento sazonal dos metadados, observada nesta investigação através do P1  
360 e P2, também pôde ser observado, mas não foi apontado por Pimenta e colaboradores (2011)  
361 em um estudo sobre a ciclagem de nutrientes desenvolvido no PEMG. Além disso, entre os  
362 metadados, também merece destaque os altos valores encontrados para o micronutriente Mn  
363 nas duas condições estudadas, especialmente no que se refere às amostras coletadas em  
364 outubro. Keiluweit e colaboradores (2015), esclarecem que este micronutriente é um recurso  
365 chave para a degradação da serapilheira nos ecossistemas florestais, pois os microrganismos  
366 recrutam e convertem os íons  $Mn^{2+}$  em  $Mn^{3+}$  que então se tornam capazes de degradar  
367 estruturas aromáticas da lignina; além disso, quando o fornecimento de quelantes  
368 estabilizadores deste íon como o oxalato e malato cessam após a morte das células, o excesso  
369 de  $Mn^{3+}$  se coprecipita com óxidos e acabam acumulando-se, assim como possivelmente  
370 aconteceu no PEMG gerando os altos valores encontrados.

371 Além disso, a diferença entre as comunidades *core* e *noncore* e sua associação  
372 majoritária com os metadados (CCA analysis) concordam com os resultados que Kielak e  
373 colaboradores (2016) obtiveram a partir de uma floresta mista da Holanda, no qual  
374 concluíram que a composição da comunidade bacteriana, especialmente nos estágios médio e  
375 finais da decomposição da serapilheira, são melhores explicados pelos mecanismos baseados  
376 na teoria de nicho que prevê que mudanças na composição de espécies não são aleatórias e

377 sim estão relacionadas a mudanças nas variáveis ambientais. Desta forma é possível apontar  
378 que esta teoria também se aplica ao PEMG e que as espécies bacterianas são selecionadas  
379 com base em sua capacidade de habitar e explorar nichos específicos e que os parâmetros  
380 ambientais são fatores do tipo *driving* para a seleção de grupos bacterianos específicos no  
381 PEMG.

382

### 383 Análises funcionais

384

#### 385 *Mapeamento Taxonômico Funcional Automatizado*

386

387 Entre todas as atribuições fenotípicas (AF) obtidas, o *cluster* que representa a  
388 produção do antibiótico estreptomicina foi o segundo *cluster* menos presente em média,  
389 contudo, Popowska e colaboradores (2012), sugeriram que nos solos florestais este antibiótico  
390 encontra-se entre as populações resistentes a menor diversidade de espécies, o que pode estar  
391 relacionado com a sua eficiência e efetividade. Neste sentido, a utilização desta estratégia  
392 pode também no PEMG ser relacionada ao desenvolvimento e manutenção de alguns grupos  
393 bacterianos específicos.

394 O *cluster* 3 (segundo *cluster* mais presente em média) se relaciona ao ciclo do enxofre,  
395 um elemento que representa entre 0,5 a 1% do peso seco de uma célula microbiana e que  
396 participa da composição dos aminoácidos, proteínas, vitaminas e da coenzima A. Além disso,  
397 atuam como ligador de metais nas enzimas e como transportador de pesticidas através da  
398 glutatona (FROSSARD et al., 2012). A predição expressiva de processos relacionados com  
399 esse ciclo, se relaciona a participação essencial do enxofre na composição de diversas  
400 biomoléculas, o que o torna um elemento imprescindível, inclusive nos solos/serapilheira do  
401 PEMG.

402 A importância das AF relacionadas com os ciclos do C e N (agrupamentos 1 e 2) é  
403 inegável, contudo também merece destaque as AF relacionadas a metabolização de pesticidas  
404 (terceiro *cluster* mais presente em média) que representa cerca de 12,96% de todas as AF  
405 (Item 4 – Tabela 4), um número relativamente baixo, mas relevante, já que estes compostos  
406 podem selecionar subpopulações microbianas e mudar toda a composição da comunidade de  
407 microrganismos (IMFELD; VUILLEUMIER, 2012). Esta situação pode ser agravada pela  
408 presença de solos com grande quantidade de matéria orgânica e argila (assim como ocorre  
409 com o solo objeto deste estudo), pois elas podem formar ligações estáveis com os pesticidas e  
410 aumentar sua permanência no solo (LANGENBACH; PAIM, 1995). Além disso, o PEMG  
411 está inserido numa região predominantemente agrícola, onde a maioria dos agricultores  
412 praticam a agricultura convencional (STIPP; OLIVEIRA, 2004) e onde parte dos insumos que  
413 utilizam acabam sendo transportados até o solo da floresta, que neste momento passa a  
414 exercer também a função de *buffer zones*, prestando o importante serviço ambiental de evitar  
415 que os pesticidas continuem sendo lixiviados (PASSEPORT et al., 2014). No entanto, todos  
416 estes processos fazem com que as comunidades microbianas tenham que tolerar estes insultos  
417 tóxicos, constituindo assim, mais um fator que soma a outros, para ajudar a explicar como as  
418 comunidades microbianas neste local são compostas.

419

420 *Cellulose-1,4-β-Cellobiases (EC 3.2.1.91)*

421

422 Além da realização e análise do mapeamento taxonômico funcional automatizado, esta  
423 investigação tentou avançar em avaliações *in vitro* realizadas a partir de predições *in silico*.  
424 Para isso, inicialmente o item degradação do xilano foi o selecionado como referencial para o  
425 estudo dos perfis metabólicos metagenômicos (PMM), pois foi o único item entre as três

426 atribuições fenotípicas que apresentaram padrão de correlação diferente das demais que  
427 estavam relacionado ao metabolismo de um macronutriente (carbono).

428 Diante de todas as predições apuradas a partir dos perfis metabólicos metagenômicos,  
429 o foco deste trabalho se voltou para as glicosidases, pois estas são as enzimas responsáveis  
430 pela degradação de polissacarídeos como o xilano. Já a seleção da enzima cellulose-1,4- $\beta$ -  
431 cellobiases (EC 3.2.1.91) foi realizada pois as lizosimas (a outras enzima predita  
432 diferencialmente) possuem atividade antibacteriana amplamente reconhecida, pois, degradam  
433 peptideoglicano (PRIMO et al., 2018) e por isso poderiam afetar o desenvolvimento dos  
434 experimentos subsequentes.

435 A predição diferencial das celobiasas entre as duas condições estudadas,  
436 possivelmente se relacione a composição da comunidade bacteriana de cada uma das  
437 amostras, especialmente no que refere aos filos mais abundantes. Štursová e colaboradores  
438 (2012) corroboram com esta hipótese, já que apuraram que a composição da comunidade  
439 bacteriana que decompunham ativamente a celulose na serapilheira e no horizonte orgânico  
440 do solo de uma floresta *Picea abies* era composta majoritariamente por Proteobacteria,  
441 Bacteroidetes e Acidobacteria, composição semelhante àquela encontrada nas amostras  
442 obtidas por este trabalho, especialmente em amostras coletadas em outubro (período onde a  
443 predição de celobiasas foi maior). No entanto, entre os três filos mais abundantes encontrados  
444 na floresta de *P. abies* citada anteriormente, somente o filo Acidobacteria não estava presente  
445 entre os três primeiros filos presentes neste trabalho e isso possivelmente aconteceu porque o  
446 pH daquele local era mais ácido do que a do PEMG, o que acaba por influenciar a  
447 recuperação de Actinobacterias (Lauber et al., 2009), um dos três filos mais presentes nas  
448 amostras coletadas em outubro.

449

450 *Ensaio enzimático in vitro baseado nos Perfis Metabólicos Metagenômicos*

451

452 Os ensaio enzimático realizado *in vitro* confirmou as predições realizadas a partir dos  
453 programas de bioinformática utilizados. Desta forma, estas ferramentas podem ser  
454 consideradas pontos de partida econômicos e lógicos que contribuem com a elaboração de  
455 novos *insights* que podem inclusive vir a redirecionar o delineamento experimental de  
456 projetos futuros; contribuindo assim para que se consiga investigar melhor uma determinada  
457 comunidade a partir do sequenciamento *metabarcoding* 16S (WOOD, 2016), inclusive  
458 atribuindo-lhes um maior valor agregado.

459

## 460 **CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO**

461

462

463 A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que apesar de  
464 existir um padrão de ocorrência dos filos mais abundantes no horizonte orgânicos e  
465 serapilheira dos solos florestais, a ocorrência dos filos menos abundantes são mais flexíveis e  
466 acabam por se adequar às especificidades de cada ambiente. No caso do PEMG, as  
467 características sazonais peculiares foram as grandes influenciadoras da composição da  
468 comunidade bacteriana que também é influenciada pelos pesticidas e sua metabolização  
469 impostas pela microrregião onde todo o conjunto florestal do PEMG está inserido.  
470 Adicionalmente, foi possível concluir que as predições funcionais foram confirmadas pelos  
471 testes *in vitro* e que estas análises podem vir complementar os estudos sobre as comunidades  
472 bacterianas investigadas a partir de sequenciamentos *metabarcoding* do gene 16S rRNA e que  
473 isso pode ser possível através de interfaces *user-friendly*.

474

475 Além disso, esses resultados sugerem também que novas investigações focadas na  
476 ação dos pesticidas devem ser realizadas no PEMG, assim como se deve incluir a preservação  
de microrganismos e de todo o patrimônio genético associado a eles ao plano de manejo do

477 PEMG e ainda que sejam adotadas medidas para mitigar os danos já causados, bem como,  
478 sejam implementadas ações para que eles não venham a ocorrer mais.

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

**507 AGRADecIMENTOS**

508

509 O nosso grupo de pesquisa agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
510 Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida, ao Instituto Chico Mendes de  
511 Conservação botânico, fúngico e microbiológico nº 56515-1 e ao Instituto Ambiental do  
512 Paraná (IAP) pela concessão da autorização de pesquisa em Unidade de Conservação do  
513 Paraná nº 57.16.

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533 **REFERÊNCIAS**

534

535

536 Aislabie J, Deslippe JR and Dymond J (2013) Soil microbes and their contribution to soil  
 537 services. In: Dymond J (ed) *Ecosystem services in New Zealand—conditions and trends*. 1st  
 538 edition. Manaaki Whenua Press, Lincoln, pp 143-161.

539

540

541 Arndt D, Xia J, Liu Y, Zhou Y, Guo AC, Cruz JA, Sinelnikov I, Nesbø CL and Wishart DS  
 542 (2012) METAGENassist: a comprehensive web server for comparative  
 543 metagenomics. *Nucleic Acids Res* 40:W88-W95.

544

545

546 Aßhauer, KP, Wemheuer B, Daniel R and Meinicke P (2015) Tax4Fun: predicting functional  
 547 profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics* 31:2882-2884.

548

549

550 Babujia LC, Hungria M, Franchini JC and Brookes PC (2010) Microbial biomass and activity  
 551 at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional  
 552 tillage. *Soil Biol Biochem* 42:2174-2181.

553

554

555 Baldrian P (2017) Microbial activity and the dynamics of ecosystem processes in forest soils.  
 556 *Curr Opin Microbiol* 37:128-134.

557

558

559 Bani A, Pioli S, Ventura M, Panzacchi P, Borruso L, Tognetti R, Toron G and Brusetti L  
 560 (2018) The role of microbial community in the decomposition of leaf litter and  
 561 deadwood. *Appl Soil Ecol* 126:75-84.

562

563

564 Bélanger N, Van Rees KCJ (2008) Sampling forest soils. In: Carter MR, Gregorich EG (eds).  
 565 *Soil sampling and methods of analysis*. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, pp 15-24.

566

567

568 Brabcová V, Nováková M, Davidová A and Baldrian P (2016) Dead fungal mycelium in  
 569 forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial  
 570 community. *New Phytol* 210:1369-1381.

571

572

573 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
 574 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

575

576

577 Deangelis KM, Allgaier M, Chavarria Y, Fortney JL, Hugenholtz P, Simmons B, Sublette K,  
 578 Silver WL and Hazen TC (2011) Characterization of trapped lignin-degrading microbes in  
 579 tropical forest soil. *PLoS One* 6:1-9.

580

581

- 582 Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Reich PB, Trivedi P, Osanai Y, Liu Y, Hamonts K,  
583 Jeffries TC and Singh BK (2016) Carbon content and climate variability drive global soil  
584 bacterial diversity patterns. *Ecol Monograph* 86:373-390.  
585  
586
- 587 Di Bitetti MS, Placci G and Dietz LA (2003) Uma visão de biodiversidade para a ecorregião  
588 Florestas do Alto Paraná - bioma Mata Atlântica: planejando a paisagem de conservação da  
589 biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação. 1st edition. World  
590 Wildlife Fund, Washington D.C., 155 pp.  
591  
592
- 593 Faoro H, Glogauer A, Souza EM, Rigo LU, Cruz LM, Monteiro RA and Pedrosa FO (2011)  
594 Identification of a new lipase family in the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome.  
595 *Environ Microbiol Rep* 3:750–755.  
596  
597
- 598 FAO (1997) Soil Map of the World. 2st edition. ISRIC. Wageningen, 217 pp.  
599  
600
- 601 Fierer N, Bradford MA and Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil  
602 bacteria. *Ecology* 88:1354-1364.  
603  
604
- 605 Frossard E, Bünermann EK, Oberson A, Jansa J and Kertesz MA (2012) Phosphorus and  
606 sulfur. In: Huang PM, Li Y, Sumner ME (eds) *Soil Handbook of Soil Science Properties and*  
607 *Process*. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, pp 1-15.  
608  
609
- 610 Hermans SM, Buckley HL, Case BS, Curran-Cournane F, Taylor M and Lear G (2016)  
611 Bacteria as emerging indicators of soil condition. *Appl Environ Microbiol* 83:1-13.  
612  
613
- 614 Imfeld G and Vuilleumier S (2012) Measuring the effects of pesticides on bacterial  
615 communities in soil: a critical review. *Eur J Soil Biol* 49:22-30.  
616  
617
- 618 Jeanbille M, Buée M, Bach C, Cébron A, Frey-Klett P, Turpault MP and Uroz S (2016) Soil  
619 parameters drive the structure, diversity and metabolic potentials of the bacterial communities  
620 across temperate beech forest soil sequences. *Microb Ecol* 71:482-493.  
621  
622
- 623 Keiluweit M, Nico P, Harmon ME, Mao J, Pett-Ridge J and Kleber M (2015) Long-term litter  
624 decomposition controlled by manganese redox cycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:5253-  
625 5260.  
626  
627
- 628 Kielak AM, Scheublin TR, Mendes LW, Van Venn JA and Kuramae EE (2016) Bacterial  
629 community succession in pine wood decomposition. *Front Microbiol* 7:1-12.  
630  
631

- 632 Kim M, Kim WS, Tripathi BM and Adams J (2014) Distinct bacterial communities dominate  
633 tropical and temperate zone leaf litter. *Microb Ecol* 67:837-848.  
634  
635
- 636 Kuzyakov Y and Blagodatskaya E (2015) Microbial hotspots and hot moments in soil:  
637 concept & review. *Soil Biol Biochem* 83:184-199.  
638  
639
- 640 Langenbach T and Paim S (1995) Os pesticidas no ecossistema do solo. *Oecol. Aust* 1:349-  
641 363.  
642  
643
- 644 Lauber CL, Hamady M and Knight R et al., Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a  
645 predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ*  
646 *Microbiol* 2009;75:5111-5120.  
647  
648
- 649 Lladó S, López-Mondéjar R, Baldrian P (2017) Forest soil bacteria: diversity, involvement in  
650 ecosystem processes, and response to global change. *Microbiol Mol Biol Rev* 81:1-27.  
651  
652
- 653 Mandels M, Andreotti R and Roche C (1976) Measurement of saccharifying cellulose.  
654 *Biotechnol Bioeng Symp* 6:21-33.  
655  
656
- 657 Palviainen M, Finér L, Laiho R, Shorohova E, Kapitsa E and Vanha-Majamaa I (2010)  
658 Carbon and nitrogen release from decomposing Scots pine, Norway spruce and silver birch  
659 stumps. *Forest Ecol Manag* 259:390-398.  
660  
661
- 662 Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P and Beiko RG (2014) STAMP: statistical analysis of  
663 taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30:3123-3124.  
664  
665
- 666 Passeport E, Richard B, Chaumont C, Margoum C, Liger L, Gril JJ and Tournebize J (2014)  
667 Dynamics and mitigation of six pesticides in a “Wet” forest buffer zone. *Environ Sci Pollut*  
668 *Res Int* 21:4883-4894.  
669  
670
- 671 Pimenta, JA, Rossi LB, Torezan JMD, Cavalheiro AL and Bianchini E (2011) Produção de  
672 serapilheira e ciclagem de nutrientes de um reflorestamento e de uma floresta estacional  
673 semidecidual no sul do Brasil. *Acta Bot Bras* 25:53-57.  
674  
675
- 676 Popowska M, Rzczycka M, Miernik A, Krawczyk-Balska A, Wash F and Duffy B (2012)  
677 Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance  
678 and associated resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1434-1443.  
679  
680

- 681 Primo ED, Otero LH, Ruiz F, Klinke S and Giordano W (2018) The disruptive effect of  
682 lysozyme on the bacterial cell wall explored by an in-silico structural outlook. *Biochem Mol*  
683 *Biol Educ* 46:83-90.
- 684  
685
- 686 Ricotta C (2017) Of beta diversity, variance, evenness, and dissimilarity. *Ecol Evol* 7:4835-  
687 4843.
- 688  
689
- 690 Snajdr J, Cajthaml T, Valášková V, Merhautová V, Petránková M, Spetz P, Leppänen K  
691 and Baldrian P (2011) Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter  
692 chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial  
693 community composition. *FEMS Microbiol Ecol* 75:291-303.
- 694  
695
- 696 Stipp NAF and Oliveira J (2004) Estudos ambientais na área da microbacia do ribeirão dos  
697 Apertados–Londrina–PR. *Geografia (Londrina)* 13:53-64.
- 698  
699
- 700 Stursová M, Zifčáková L, Leigh MB, Burgess R and Baldrian P (2012) Cellulose utilization  
701 in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiol*  
702 *Ecol* 80:735-746.
- 703  
704
- 705 Tedersoo L, Bahram M, Cajthaml T, Põlme S, Hiiesalu I, Anslan S, Harend H, Buegger  
706 F, Pritsch K, Koricheva J, Abarenkov K (2016) Tree diversity and species identity effects on  
707 soil fungi, protists and animals are context dependent. *ISME J* 10:346-362.
- 708  
709
- 710 Tláškal V, Voříšková J, Baldrian P (2016) Bacterial succession on decomposing leaf litter  
711 exhibits a specific occurrence pattern of cellulolytic taxa and potential decomposers of fungal  
712 mycelia. *FEMS Microbiol Ecol* 92:1-10.
- 713  
714
- 715 Urbanová M, Šnajdr J, Baldrian P (2015) Composition of fungal and bacterial communities in  
716 forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biol Biochem* 84:53-64.
- 717  
718
- 719 Voříšková J and Baldrian P (2013) Fungal community on decomposing leaf litter undergoes  
720 rapid successional changes. *ISME J* 7:477-486.
- 721  
722
- 723 Keegan KP, Glass EM, Meyer F (2016) MG-RAST, a metagenomics service for analysis of  
724 microbial community structure and function. In: Martin F and Uroz S (eds) *Microbial*  
725 *Environmental Genomics (MEG)*. 1st edition. Humana Press, New York, pp. 207-233.
- 726  
727
- 728 WOOD J (2016) Predictive metagenomics profiling: why, what and how? *Bioinformatics Rev*  
729 2:1-4.
- 730

731 **RECURSOS DA INTERNET**

732

733 Corrplot R package, <https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/vignettes/corrplot->

734 intro.html (November 20, 2018)

735

736 INMET 2018, <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/index> (August 12, 2018)

737

738 MG-RAST portal, <https://www.mg-rast.org/mgmain.html?mgpage=project&project=>

739 a6969f40b86d677038333333530 (March 20, 2019)

740

741 METAGENassist, <http://www.metagenassist.ca/METAGENassist/faces/Home.jsp> (November

742 2, 2018)

743

744 Vegan package, <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf> (November 15, 2018)

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756 **TABELAS 1-3**

757

758 Tabela 1 – Estimativas de riqueza (Chao1); dominância (Simpson) e equabilidade (Shannon)

759 obtidas através das comunidades bacterianas (a nível de filo) de amostras de solo/serapilheira

760 coletadas em abril e em outubro no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

761

Índices	Abril	Outubro	<i>p-value</i>
Chao1	26	21	0,002
Shannon	2,19	1,96	0,024
Simpson	0,81	0,84	0,138

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779 Tabela 2 – Análise química do solo obtida a partir de amostras de solo/serapilheira coletadas  
 780 em abril e outubro no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

781

782

783

784

785

786

	MACRONUTRIENTES					
	C (g/dm <sup>3</sup> )	N (g/dm <sup>3</sup> )	P (g/dm <sup>3</sup> )	K <sup>+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	Ca <sup>+2</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	Mg <sup>+2</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )
<b>Abril</b>	72,67	7,5	6,47	0,96	17,2	3,41
<b>Outubro</b>	37,12	3,19	2,55	1,33	13,23	3,02

	MICRONUTRIENTES				pH	H <sup>+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	Al <sup>+3</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )
	Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	Mn (mg/dm <sup>3</sup> )			
<b>Abril</b>	1,53	21,36	19,11	238,07	5,68	2,64	0,08
<b>Outubro</b>	3,05	10,94	14,93	322,14	5,2	2,86	0

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803 Tabela 3 – Atribuições fenotípicas [abundância relativa (%)] recuperadas a partir da  
 804 classificação taxonômica obtidas através da ferramenta METAGENassist para as amostras  
 805 coletadas em abril e outubro no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

806

Predição	Abril	Outubro	
1-Ammonia oxidizer	11,679	13,550	
1-Nitrite reducer	12,091	12,682	
1-Nitrogen fixation	4,775	6,837	
2-Sulfate reducer	10,897	12,186	
2-Sulfide oxidizer	7,843	7,637	
2-Sulfur metabolizing	0,580	0,751	
3-Carbon fixation	0,163	0,318	
3-Chitin degradation	5,324	7,134	
3-Lignin degrader	0,451	0,982	
3-Xylan degrader	6,166	6,164	
4-Atrazine metabolism	0,574	1,048	1 ciclo nitrogênio
4-Chlorophenol degrading	0,372	1,347	2 ciclo enxofre
4-Degrades aromatic hydroc.	0,964	0,352	3 ciclo do carbono
4-Dehalogenation	9,599	13,027	4 pesticidas
5-Streptomycin producer	3,614	4,145	5 antibiótico
6-UNKNOWN	24,485	11,079	6 não atribuído

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819 LEGENDAS PARA AS FIGURAS 1-6 e FIGURAS SUPLEMENTARES 1-3

820

821 Figura 1- Vista aérea do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina – Brasil,  
822 destacando o local da coletas do solo/serapilheira que serviram de amostragem para a  
823 realização deste estudo (23° 26' 42'' S, 51° 14' 54'' W).

824

825 Figura 2 – Análises sobre a composição bacteriana ao nível de filo em amostras de  
826 solo/serapilheira coletadas em abril e outubro no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

827 2A – Abundância relativa filtradas de acordo com 0,5% de ocorrência. 2B – Comunidade *core*  
828 (presente na intersecção do gráfico e composta pelos filós Proteobacteria, Actinobacteria,  
829 Firmicutes, Acidobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Nitrospirae, Gemmatimonadetes,  
830 Thermotogae, Chloroflexi, Planctomycetes, Cyanobacteria, Chlorobi, Spirochaetes, Chlamydiae,  
831 Synergistetes, Tenericutes, Thermodesulfobacteria, Deferribacteres, Elusimicrobia e Deinococcus-  
832 Thermus e *noncore* (presentes exclusivamente nas amostras coletadas no outono e composta pelos  
833 filós Dictyoglomi, Fibrobacteres, Aquificae, Fusobacteria e Lentisphaerae). 2C – Quatro principais  
834 filós estatisticamente diferentes classificados de acordo com o *effect sizes*.

835

836 Figura 3 - Análise de agrupamentos realizados através de dissimilaridades (3A) e de  
837 clusterização aglomerativa (3B) obtidas através das comunidades bacterianas (a nível de filo)  
838 de amostras de solo/serapilheira coletadas em abril e outubro no Parque Estadual Mata dos  
839 Godoy (PEMG).

840

841 Figura 4 - Correlograma entre todos os filós bacterianos obtidos de amostras de  
842 solo/serapilheira coletadas em abril e outubro no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e  
843 os padrões 1 e 2 (P1 e P2). No P1, os valores do pH, M0, Al, C, N, P, Ca, Mg e dos

844 micronutrientes Zn e Fe foram sempre maiores nas amostras coletadas em abril, já no P2 os  
845 valores da relação C:N, K e micronutrientes Mn e Cu eram sempre maiores nas amostras  
846 coletadas em outubro.

847

848 Figura 5 - Correlograma entre todas as atribuições fenotípicas obtidas através da ferramenta  
849 METAGENassist para amostras de solo/serapilheira coletadas em abril e outubro no Parque  
850 Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

851

852 Figura 6 – Atividade específica para a enzima celulose-1,4- $\beta$ -cellobiases (EC 3.2.1.91) obtida  
853 a partir de amostras do solo do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

854

855 Figura Suplementar 1 – Correlograma entre todos os filos presentes no horizonte orgânicos de  
856 amostras obtidas a partir do solo/serapilheira do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

857

858 Figura Suplementar 2 – Análise de similaridade percentual (SIMPER) dos filos bacterianos  
859 presentes em amostras contrastantes para a deposição de serapilheira obtidos a partir do  
860 Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

861

862 Figura Suplementar 3 – Enzimas glicosidases diferencialmente preditas obtidas a partir dos  
863 perfis metagenômicos preditivos construídos com o auxílio do programa de bioinformática  
864 Tax4fun, utilizando para isso, as atribuições taxonômicas apuradas através do sequenciamento  
865 *metabarcoding* do gene 16S rRNA de amostras de solo/serapilheira do Parque Estadual Mata  
866 dos Godoy (PEMG).

867

868

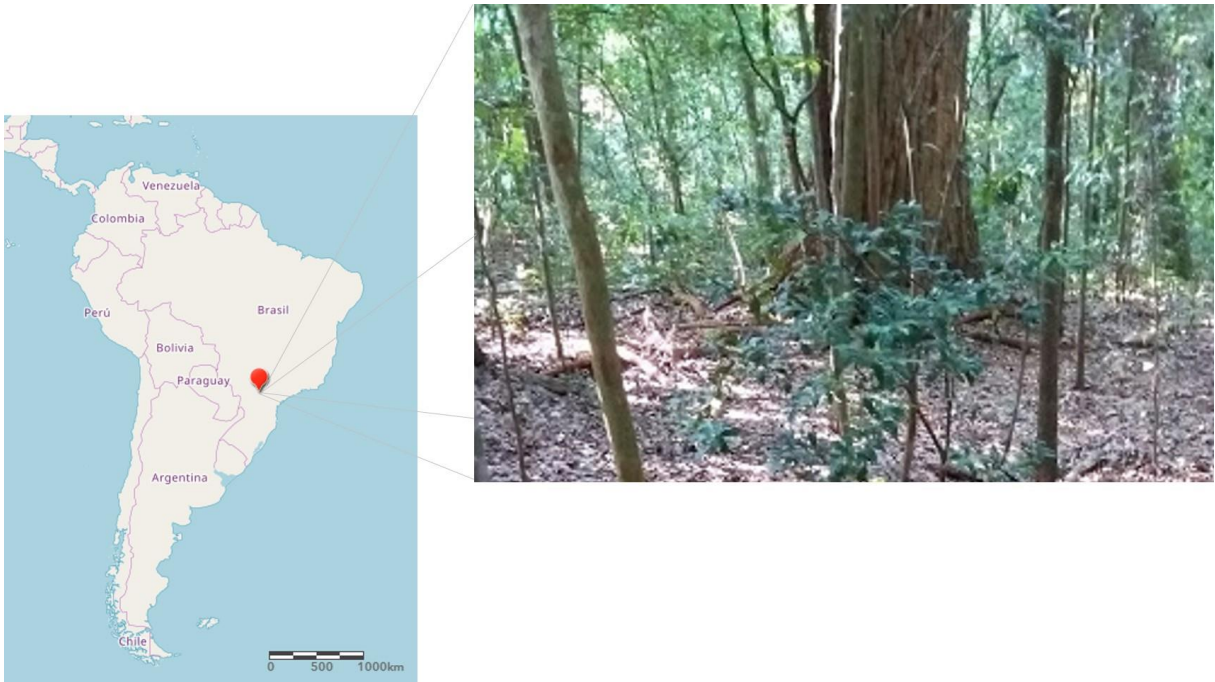
869 **FIGURAS 1-6**

870

871 **Figura 1**

872

873



874

875

876

877

878

879

880

881

882

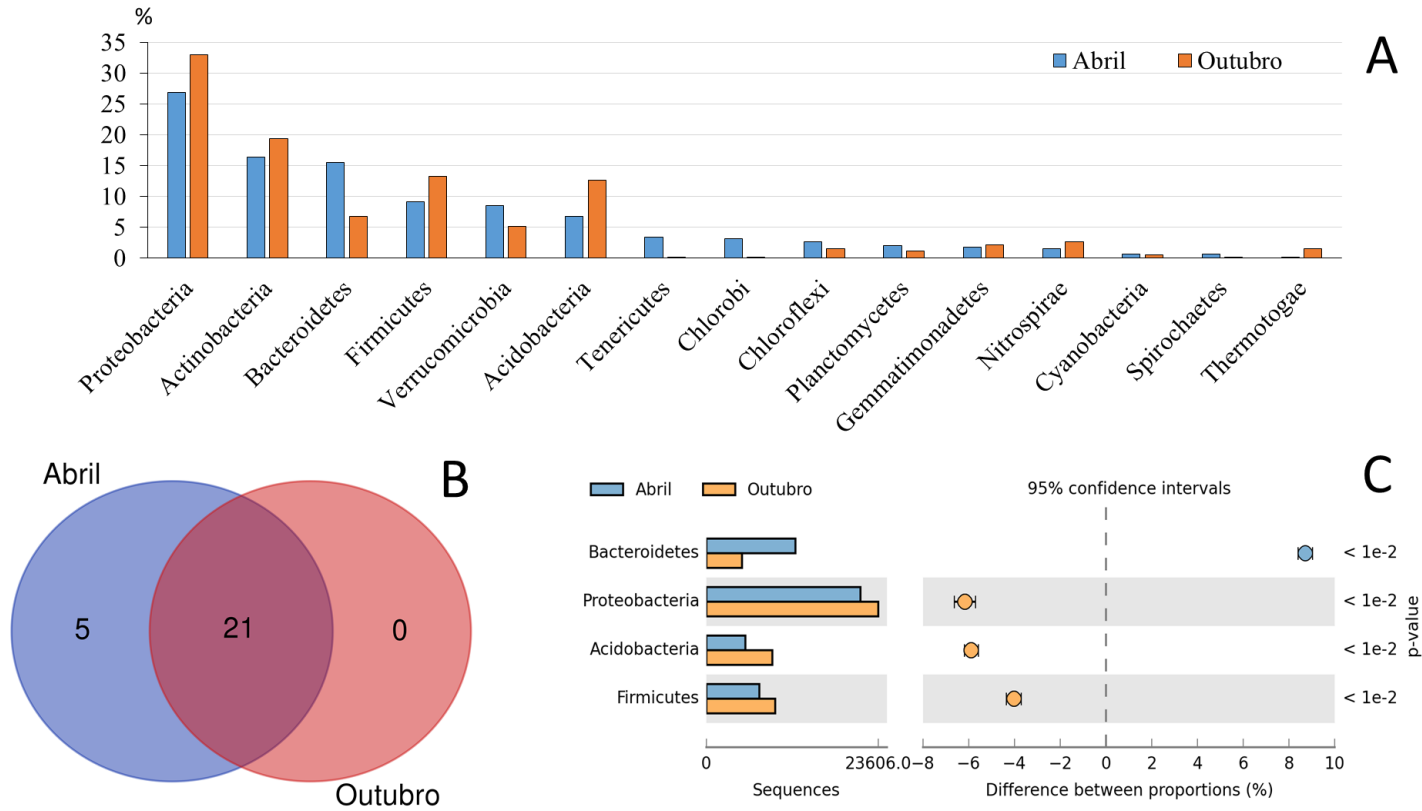
883

884

885 Figura 2

886

887



888

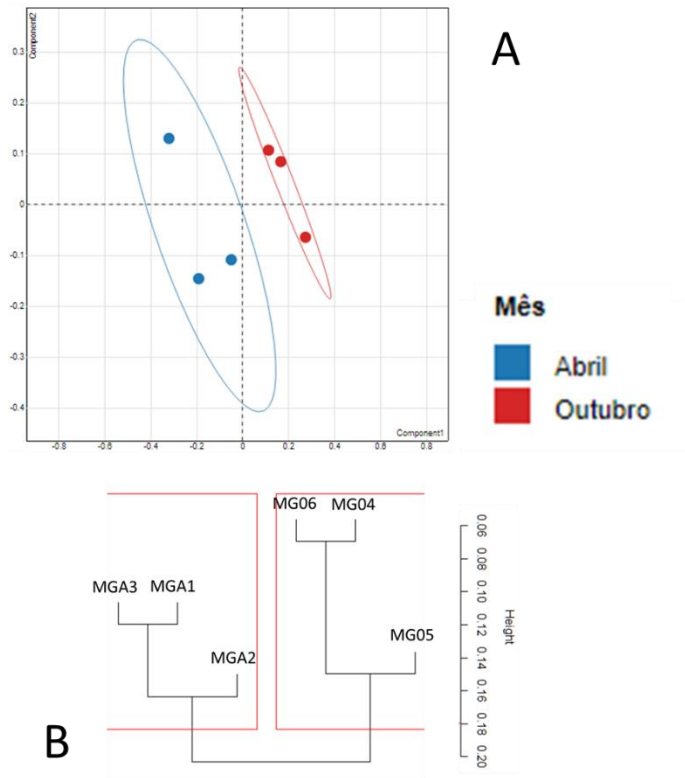
889

890

891 Figura 3

892

893



894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

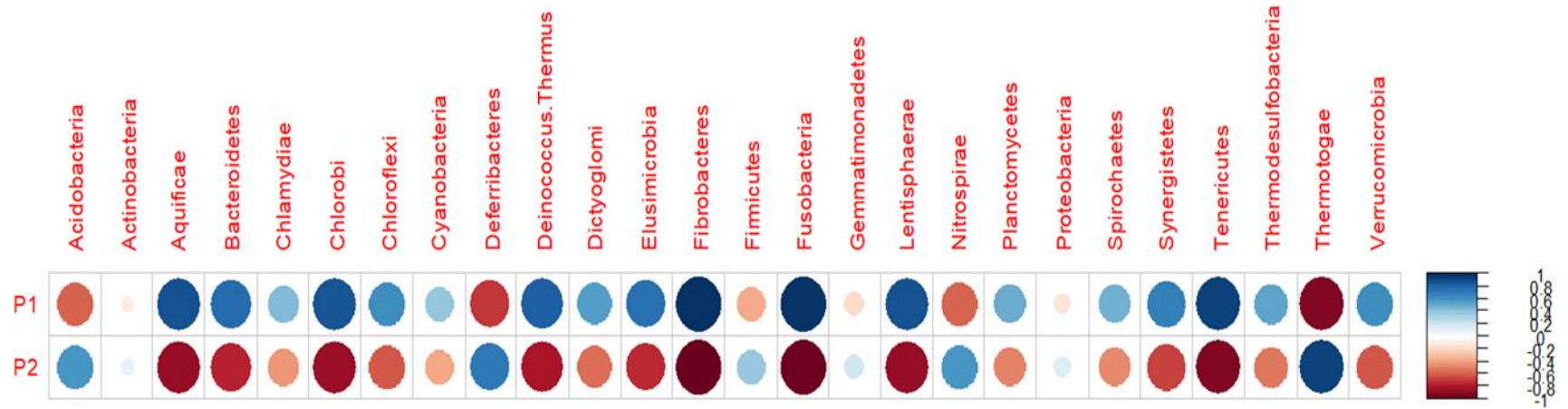
906 Figura 4

907

908

909

910



911

912

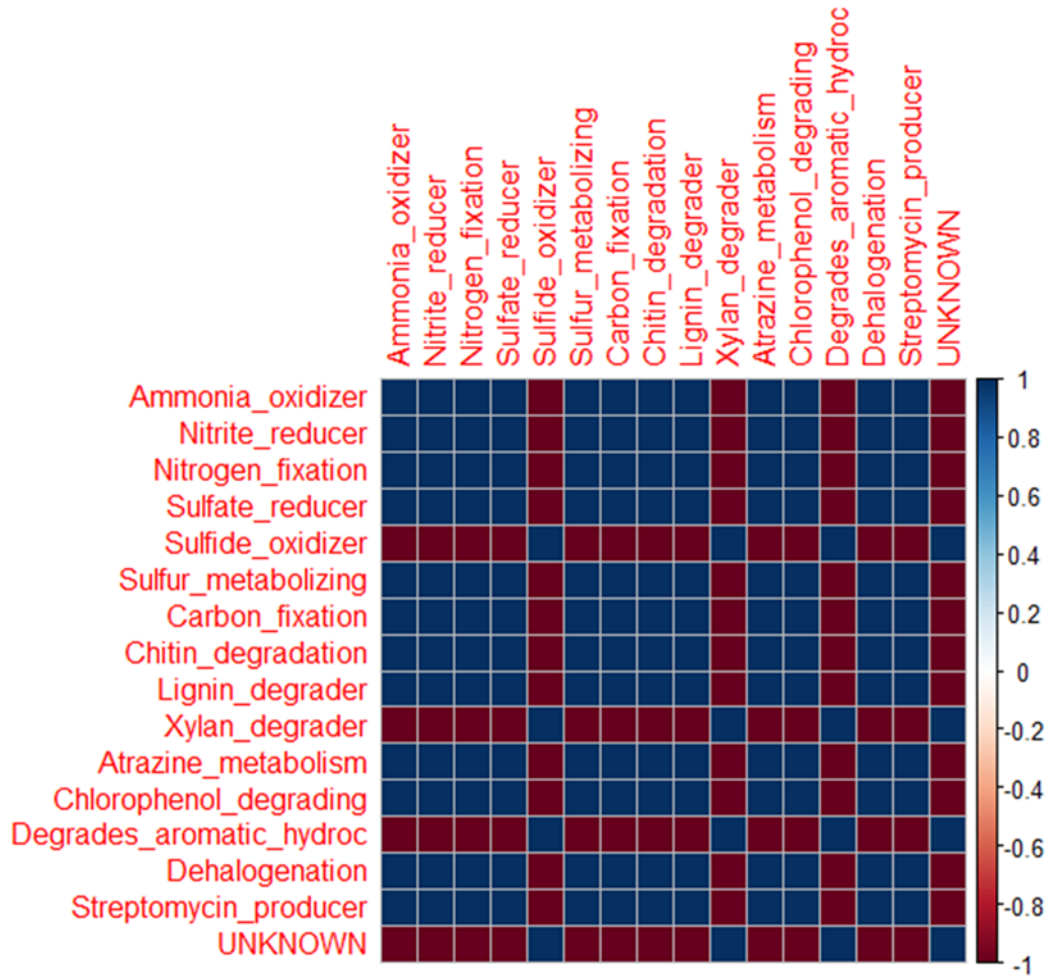
913

914

915 Figura 5

916

917



918

919

920

921

922

923

924

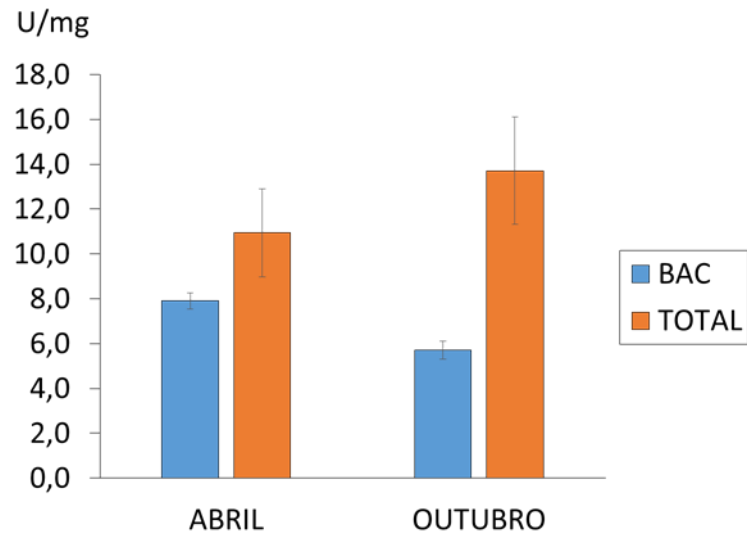
925

926

927 Figura 6

928

929



930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945 **MATERIAL SUPLEMENTAR**

946

947 Tabela Suplementar 1 – Número de sequências brutas, número de *reads* preditos como rRNAs  
 948 e Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) classificadas a nível de filo obtidas a partir  
 949 das análises *upstream* realizadas no servidor online MG-RAST para amostras de  
 950 solo/serapilheira coletadas em abril e outubro no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

951

Estação do ano	Amostras	<i>reads</i> submetidos	rRNAs preditos	OTUs de bactéria a nível de filo
ABRIL	MGA1	178.856	175.778	114.861
	MGA2	126.755	124.829	78.825
	MGA3	71.583	70.488	43.412
OUTUBRO	MGO4	141.704	138.504	56.239
	MGO5	236.988	232.517	105.430
	MGO6	122.211	119.532	53.090

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

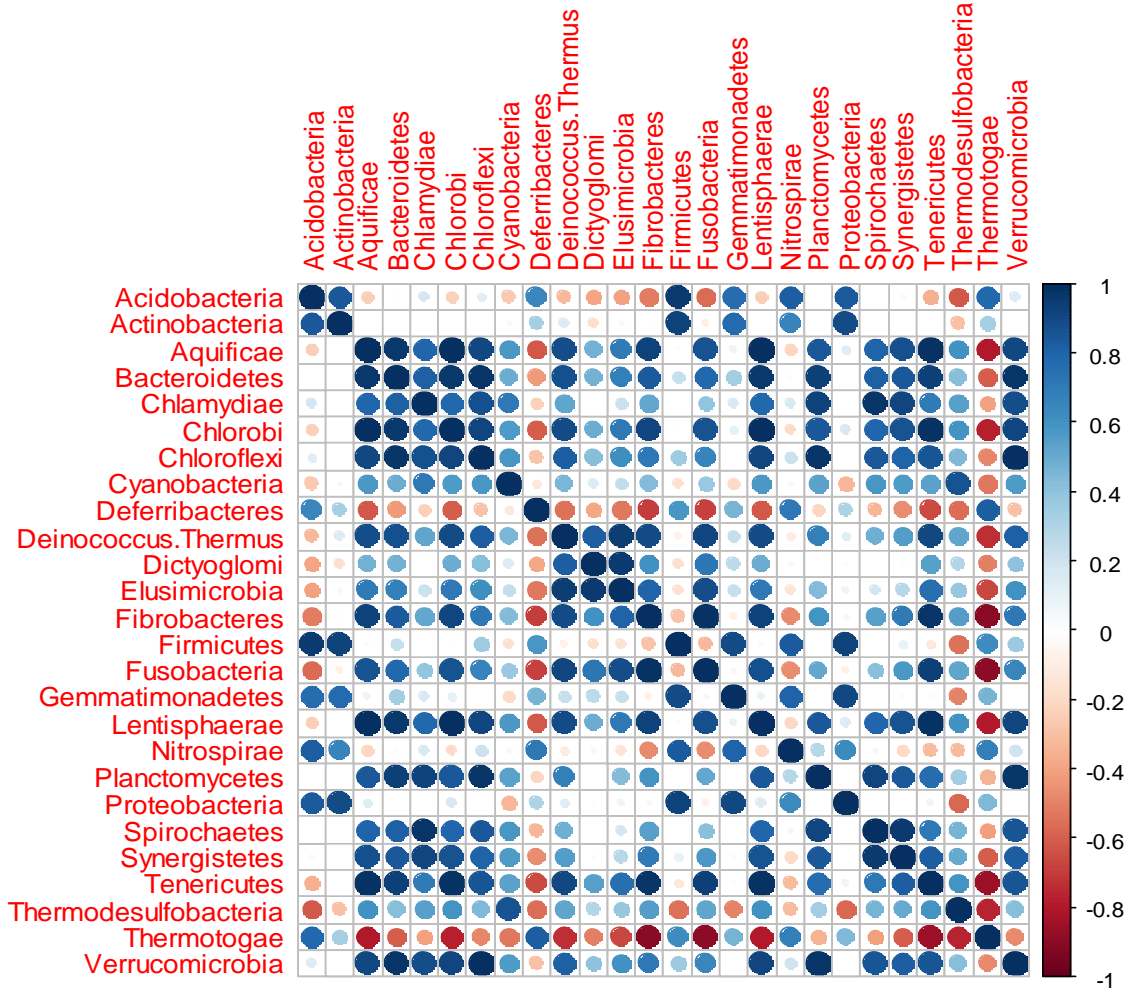
Tabela Suplementar 2 – Perfis metagenômicos funcionais de glicosidades (EC 3.2.1-) obtidos a partir do sequenciamento *metabarcoding* do gene 16S rRNA de amostras do solo/serapilheira do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

Sample ID	MGA1	MGA2	MGA3	MGO4	MGO5	MGO6
K01176; alpha-amylase [EC:3,2,1,1]	8,54E+13	0,0001	0,0002	0,0003	0,0002	0,0002
K01178; glucoamylase [EC:3,2,1,3]	0,0002	0,0002	0,0002	7,44E+13	7,28E+13	7,32E+13
K01179; endoglucanase [EC:3,2,1,4]	0,0003	0,0004	0,0005	0,0012	0,0008	0,0008
K01180; endo-1,3(4)-beta-glucanase [EC:3,2,1,6]	2,64E+10	2,84E+10	6,07E+10	5,19E+08	7,89E+09	9,23E+09
K01181; endo-1,4-beta-xylanase [EC:3,2,1,8]	0,0002	0,0002	0,0003	0,0004	0,0002	0,0003
K01182; oligo-1,6-glucosidase [EC:3,2,1,10]	5,96E+13	6,62E+13	0,0001	9,65E+12	9,48E+13	9,52E+13
K01183; chitinase [EC:3,2,1,14]	0,0001	0,0001	0,0003	0,0004	0,0003	0,0003
K01184; polygalacturonase [EC:3,2,1,15]	2,12E+13	2,09E+13	1,94E+12	8,93E+12	9,39E+12	7,84E+12
K01185; lysozyme [EC:3,2,1,17]	0,0002	0,0002	0,0002	3,8E+13	4,75E+13	4,64E+13
K01186; sialidase-1 [EC:3,2,1,18]	2,8E+13	3,08E+13	4,9E+13	0,0002	0,0001	0,0002
K01187; alpha-glucosidase [EC:3,2,1,20]	0,0006	0,0006	0,0007	0,0007	0,0006	0,0006
K01190; beta-galactosidase [EC:3,2,1,23]	0,0003	0,0003	0,0004	0,0003	0,0002	0,0002
K01191; alpha-mannosidase [EC:3,2,1,24]	8,81E+13	9,77E+13	0,0002	0,0001	7,8E+13	7,72E+13
K01192; beta-mannosidase [EC:3,2,1,25]	0,0002	0,0002	0,0002	0,0001	9,34E+13	8,42E+13
K01193; beta-fructofuranosidase [EC:3,2,1,26]	0,0001	0,0001	0,0001	8,33E+13	6,21E+13	5,5E+13
K01194; alpha,alpha-trehalase [EC:3,2,1,28]	4,72E+13	4,77E+13	7,78E+13	7,3E+13	9,4E+13	8,3E+13
K01195; beta-glucuronidase [EC:3,2,1,31]	2,76E+13	2,75E+13	3,58E+13	6,98E+13	1,77E+13	1,62E+13
K01197; hyaluronoglucosaminidase [EC:3,2,1,35]	1,77E+13	1,89E+13	2,7E+13	8,36E+12	1,03E+13	1,03E+13
K01198; xylan 1,4-beta-xylosidase [EC:3,2,1,37]	0,0001	0,0001	0,0001	5,32E+12	3,25E+12	3,26E+13
K01199; glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase [EC:3,2,1,39]	8,47E+12	8,72E+12	1,28E+13	1,75E+13	1,99E+13	1,68E+13
K01200; pullulanase [EC:3,2,1,41]	6,26E+13	6,85E+13	0,0001	0,0003	0,0003	0,0002
K01201; glucosylceramidase [EC:3,2,1,45]	3,41E+13	4,45E+13	8,25E+13	0,0002	0,0002	0,0001
K01205; alpha-N-acetylglucosaminidase [EC:3,2,1,50]	1,58E+13	1,54E+12	1,97E+13	4,59E+12	7,03E+12	7,24E+12
K01206; alpha-L-fucosidase [EC:3,2,1,51]	8,44E+13	8,53E+13	0,0001	0,0002	0,0001	0,0002

K01207; beta-N-acetylhexosaminidase [EC:3,2,1,52]	0,0005	0,0005	0,0005	0,0007	0,0007	0,0007
K01208; cyclomaltodextrinase [EC:3,2,1,54]	1,42E+12	1,63E+12	2,68E+12	5,04E+12	5,79E+12	4,37E+12
K01209; alpha-N-arabinofuranosidase [EC:3,2,1,55]	0,0001	0,0001	0,0001	9,73E+13	4,74E+13	4,4E+13
K01210; glucan 1,3-beta-glucosidase [EC:3,2,1,58]	0,0001	9,88E+13	5,58E+12	6,72E+11	8,66E+12	8,93E+12
K01212; levanase [EC:3,2,1,65]	4,28E+13	4,65E+13	6,85E+13	4,87E+13	4,45E+13	6,26E+13
K01215; glucan 1,6-alpha-glucosidase [EC:3,2,1,70]	1,16E+13	1,22E+13	1,63E+13	1,7E+13	1,9E+13	1,46E+13
K01216; licheninase [EC:3,2,1,73]	1,08E+11	1,11E+11	1,56E+11	4,63E+12	5,4E+12	3,97E+12
K01218; mannan endo-1,4-beta-mannosidase [EC:3,2,1,78]	3,57E+13	3,54E+13	6,6E+13	0,0001	4,96E+13	5,23E+13
K01219; agarase [EC:3,2,1,81]	2,77E+13	2,65E+13	2,03E+13	1,03E+13	9,24E+11	1,37E+13
K01220; 6-phospho-beta-galactosidase [EC:3,2,1,85]	2,15E+13	2,39E+13	4,18E+13	2,37E+12	4,82E+12	5,37E+12
K01222; 6-phospho-beta-glucosidase [EC:3,2,1,86]	4,5E+13	4,85E+13	8E+13	0,0001	9,07E+13	7,36E+13
K01224; arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase [EC:3,2,1,89]	3,09E+13	3,29E+13	6,23E+12	8,48E+13	2,97E+13	2,78E+13
K01225; cellulose 1,4-beta-cellobiosidase [EC:3,2,1,91]	3,62E+12	3,84E+12	7,89E+12	2,52E+13	3,06E+13	2,47E+13
K01226; trehalose-6-phosphate hydrolase [EC:3,2,1,93]	6,21E+13	6,92E+13	0,0001	3,38E+13	3,95E+13	3,78E+13
K01227; mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase [EC:3,2,1,96]	1,52E+13	1,7E+13	2,87E+13	8,95E+11	8,34E+12	9,85E+12
K01230; mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase [EC:3,2,1,113]	2,62E+12	2,31E+11	2,39E+12	3,78E+10	6,61E+11	6,48E+11
K01232; maltose-6'-phosphate glucosidase [EC:3,2,1,122]	1,36E+12	1,45E+13	2,53E+13	1,02E+13	5,85E+11	7,86E+11
K01233; chitosanase [EC:3,2,1,132]	7,66E+12	7,62E+12	7,46E+12	1,6E+12	1,54E+12	1,69E+12
K01234; neopullulanase [EC:3,2,1,135]	2,52E+13	2,77E+13	5,4E+12	5,2E+13	6,26E+13	5,23E+13
K01235; alpha-glucuronidase [EC:3,2,1,139]	5,14E+13	5,23E+13	8,85E+13	8,95E+13	3,78E+12	3,31E+13
K01236; maltooligosyltrehalose trehalohydrolase [EC:3,2,1,141]	0,0003	0,0003	0,0003	0,0002	0,0002	0,0002
K01238; [EC:3,2,1,-]	0,0005	0,0004	0,0008	0,0054	0,0037	0,0037

957 Figura Suplementar 1

958



959

960

Fonte: o próprio autor

961

962

963

964

965

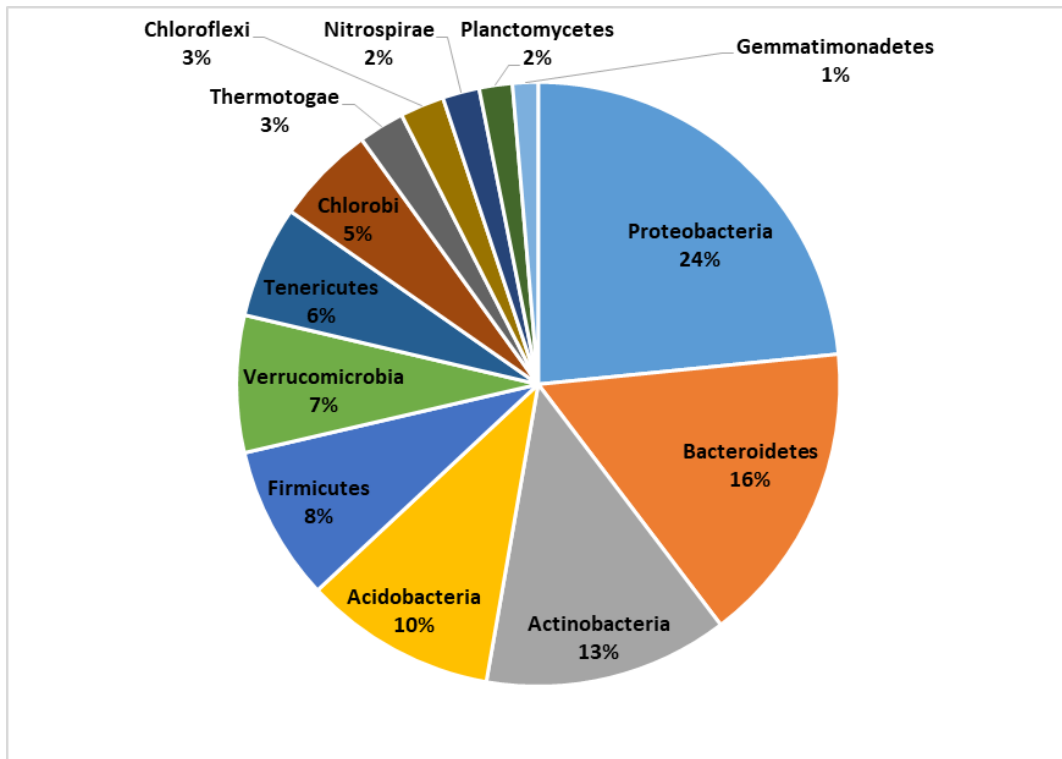
966

967

968

969 Figura Suplementar 2

970



971

972

Fonte: o próprio autor

973

974

975

976

977

978

979

980

981

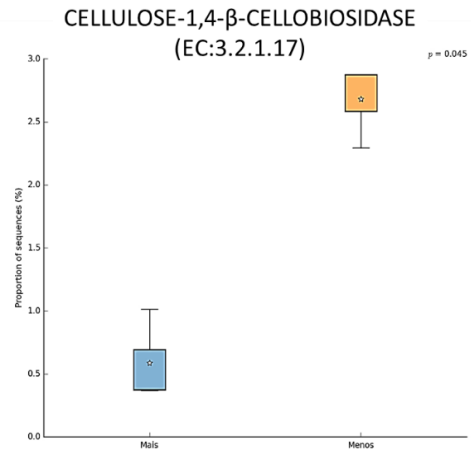
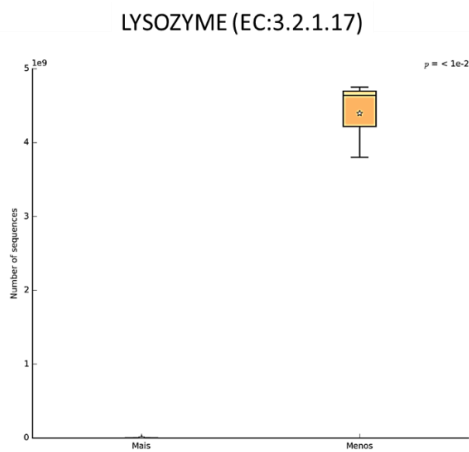
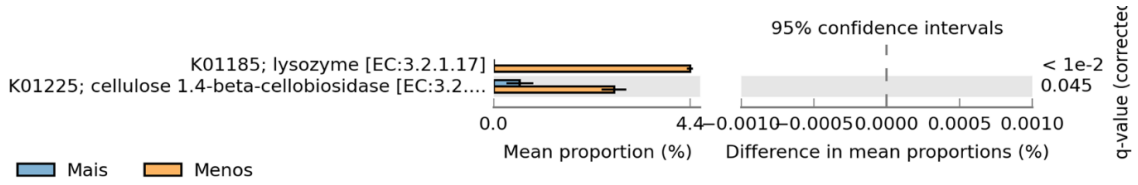
982

983

984

985 Figura Suplementar 3

986



987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

## 5- REFERÊNCIAS

ABHAUER, K. P. et al. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 17, p. 2882-2884, 2015.

BANI, A. et al. The role of microbial community in the decomposition of leaf litter and deadwood. **Applied Soil Ecology**, v. 126, p. 75-84, 2018.

BÉLANGER, N.; VAN REES K.C.J. Sampling forest soils. *In*: CARTER, M.R.; GREGORICH, E.G. **Soil sampling and methods of analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2008, 15-24.

BIANCHINI, E. et al. Spatial and temporal variation in the canopy cover in a tropical semi-deciduous forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 269-276, 2001.

BIANCHINI, E. et al. Diversidade e estrutura de espécies arbóreas em área alagável do município de Londrina, sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 3, p. 405-419, 2003.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265-270, 1984.

COX, M. P.; PETERSON, D. A.; BIGGS, P. J. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2010.

DANCEY, C. P.; REIDY, J. Análise de correlação: o *r* de Person. *In*: DANCEY, C. P.; REIDY, J. **Estatística sem matemática para psicologia**. Porto Alegre: Penso, 2013.

DHARIWAL, A. et al. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W180-W188, 2017.

DI BITETTI, M.S.; PLACCI, G.; DIETZ, L.A. **Uma visão de biodiversidade para a ecorregião Florestas do Alto Paraná - bioma Mata Atlântica: planejando a paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação**. Washington: World Wildlife Fund, 2003.

DUDHAGARA, P. et al. Web resources for metagenomics studies. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 296-303, 2015.

FAO. Soil map of the world. 2<sup>a</sup> ed. Wageningen. ISRC, 1997. 217 p.

FELCZYKOWSKA, A. et al. Sampling, metadata and DNA extraction-important steps in metagenomic studies. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 1, p. 151-160, 2015.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 9, n. 1, p. 115-146, 2009.

FOUDYL-BEY, S.; BRAIS, S.; DROUIN, P. Litter heterogeneity modulates fungal activity, C mineralization and N retention in the boreal forest floor. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 100, p. 264–275, 2016.

FU, L. et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 23, p. 3150-3152, 2012.

GEETHANJALI, P.; JAYASHANKAR, P. M. A Review on Litter Decomposition by Soil Fungal Community. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 11, n. 4, p. 01–03, 2016.

GLOOR, G. ALDEx2: ANOVA-Like Differential Expression tool for compositional data. **ALDEX Manual Modular**, v. 20, p. 1-11, 2017.

GOOGLE MAPS. Mapa do Parque Estadual Mata dos Godoy. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-23.4474528,-51.2532443,4644m/data=!3m1!1e3>>. Acesso em: 2 de nov. de 2018.

GOMES, A. P et al. Uso de variáveis dendrométricas na estimativa de serrapilheira em área de floresta secundária inicial e floresta madura. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 7, n. 1, p. 13–21, 2009.

GROSSO, F.; BÅÅTH, E.; DE NICOLA, F. Bacterial and fungal growth on different plant litter in Mediterranean soils: Effects of C/N ratio and soil pH. **Applied Soil Ecology**, v. 108, p. 1–7, 2016.

HAMADY, M; KNIGHT, R. Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques, and challenges. **Genome Research**, v. 19, n. 7, p. 1141-1152, 2009.

HUGERTH, L. W.; ANDERSSON, A. F. Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: from sampling to hypothesis testing. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1561, p. 1-22, 2017.

IAP. 2002. Plano de Manejo do Parque Estadual Mata dos Godoy – Instituto Ambiental do Paraná Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/pagina-1218.html>>. Acesso em: 24 de out. de 2016.

IAP. 2018. Pesquisas Científicas em Unidades de Conservação – Instituto Ambiental do Paraná Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/pagina-1278.html>>. Acesso em: 24 de out. de 2018.

IBGE. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

INMET. Temperatura e precipitação pluviométrica em Londrina. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/porta1/index.php?r=home/index>>. Acesso em: 12 de ago. de 2018.

KENT, W. J. BLAT—the BLAST-like alignment tool. **Genome Research**, v. 12, n. 4, p. 656-664, 2002.

KIM, B. et al. Deciphering diversity indices for better understanding of the microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089-2093, 2017.

KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 184–199, 2015.

LA ROSA, P. S. et al. Hypothesis testing and power calculations for taxonomic-based human microbiome data. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. 1-13, 2012.

LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, p. R25.1-R25.10, 2009.

LLADÓ, S.; LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; BALDRIAN, P. Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 2, p. 1-27, 2017.

LOMBARD, N. et al. Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 1, p. 31-49, 2011.

LOVE, M, I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1-21, 2014.

MATARAGAS, M. et al. A bioinformatics pipeline integrating predictive metagenomics profiling for the analysis of 16S rDNA/rRNA sequencing data originated from foods. **Food Microbiology**, v. 76, p. 279-286, 2018.

MELATTI, C.; ARCHELA, R. S. Avaliação dos impactos do uso público em trilhas: uma metodologia baseada no estudo de uma trilha interpretativa-Parque Estadual Mata dos Godoy, Paraná. **Confins. Revue Franco-Brésilienne de Géographie/Revista Franco-Brasileira de Geografia**, n. 20, 2014.

MISHRA, G.; KUMAR, R. Plant litter decomposition: drivers insight to the ecological process. **European Journal of Biological Research**, v. 6, n. 3, p. 176–185, 2016.

ODINTSOVA, V.; TYAKHT, A.; ALEXEEV, D. Guidelines to Statistical Analysis of Microbial Composition Data Inferred from Metagenomic Sequencing. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 24, p. 17-36, 2017.

OKSANEN, J. et al. Package ‘vegan’. **Community Ecology Package**, v. 2, n. 9, p.1-297, 2013.

PAULSON, J. N.; POP, M.; BRAVO, H. C. metagenomeSeq: Statistical analysis for sparse high-throughput sequencing. **Bioconductor Package**, v. 1, n. 0, p. 1-32, 2013.

PEZZATTO, A. W.; WISNIEWSKI, C. Produção De Serapilheira Em Diferentes Seres Sucessionais Da Floresta Estacional Semidecidual No Oeste Do Paraná. **Floresta**, v. 36, n. 1, p. 111–120, 2006.

PIMENTA, J. A.; ROSSI, L. B.; MARCELO, J.; et al. Produção de serrapilheira e ciclagem de nutrientes de um reflorestamento e de uma floresta estacional semidecidual no sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 53–57, 2011.

PINTO, S. I. D. C.; MARTINS, S. V.; BARROS, N. F. DE; DIAS, H. C. T. Produção de serapilheira em dois estádios sucessionais de floresta estacional semidecidual na Reserva Mata do Paraíso, em Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 545–556, 2008.

PURAHONG, W. et al. Life in leaf litter: novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 16, p. 4059–4074, 2016.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 576–590, 2008.

RAMAZZOTTI, M.; BACCI, G. 16S rRNA-Based Taxonomy Profiling in the Metagenomics Era. *In*: NAGARAJAN M. **Metagenomics Perspectives, Methods, and Applications**. London: Academic Press, 2018. p. 103–119.

RAMIRO-GARCIA, J. et al. NG-Tax, a highly accurate and validated pipeline for analysis of 16S rRNA amplicons from complex biomes. **F1000 Research**, v. 5, n. 1791, p. 1–44, 2019.

REUTER, J. A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, M. P. High-throughput sequencing technologies. **Molecular Cell**, v. 58, n. 4, p. 586–597, 2015.

RICOTTA, C. Of beta diversity, variance, evenness, and dissimilarity. **Ecology and evolution**, v. 7, n. 13, p. 4835–4843, 2017.

ROBINSON, D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010.

RODERJAN, C. V. et al. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná, Brasil. **Ciência & Ambiente**, v. 24, n. 1, p. 75–92, 2002.

ROMANOWICZ, K. J. et al. Active microorganisms in forest soils differ from the total community yet are shaped by the same environmental factors: the influence of pH and soil moisture. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 10, p.1-9, 2016.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell system Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379-423, 1948.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, p. 688, 1949.

SOARES, M. T. S.; FROUFE, L. C. M. Estimativa de ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais por meio da produção e decomposição de serapilheira. In: PARRON, L. M. et al. **Serviços Ambientais em Sistemas Agrícolas e Florestais do Bioma Mata Atlântica**. Brasília: Embrapa Florestas, 2015. 155-170.

ŠTURSOVÁ, M. et al. Cellulose utilization in forest litter and soil: Identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 735–746, 2012.

VARTOUKIAN, S. R. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria. **Journal of Oral Biosciences**, v. 58, n. 4, p. 143-149, 2016.

VITAL, A. R. T.; GUERRINI, I. A.; FRANKEN, W. K.; FONSECA, R. C. B. Produção de serapilheira e ciclagem de nutrientes de uma floresta estacional semidecidual em zona ripária. **Revista Árvore**, v. 28, n. 6, p. 793–800, 2004.

WEI, T. et al. Package ‘corrplot’. **Statistician**, v. 56, p. 316-324, 2017.

WEATHER SPARK. Condições meteorológicas médias de Londrina. Disponível em: <<https://pt.weatherspark.com/y/29737/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Londrina-Brasil-durante-o-ano#Sections-Sources>>. Acesso em: 2 de nov. de 2018.

WILKE, A. et al. The MG-RAST pipeline In: WILKE, A. et al. **MG-RAST Manual for version 4, revision 3**. Chicago: Argonne National Laboratory, 2016. 15-18

WOOD, J. Predictive metagenomics profiling: why, what and how? **Bioinformatics Review**, v. 2, n. 4, p. 1-4, 2016.

ZANGARO, W.; ROSTIROLA, L. V.; DE SOUZA, P. B.; et al. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. **Mycorrhiza**, v. 23, n. 3, p. 221–233, 2013.

## 6 - ANEXOS 1 a 3

### ANEXO 1

Tabela Complementar 1 – Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) ao nível de filo obtidas a partir de amostras de solo/serapilheira no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

Filo	MGA1	MGA2	MGA3	MGO4	MGO5	MGO6
Acidobacteria	8581	4635	2865	7432	12846	6927
Actinobacteria	20785	10957	7009	11343	20457	9876
Aquificae	75	48	26	0	0	0
Bacteroidetes	17248	12565	6990	4385	6954	3279
Chlamydiae	80	27	18	30	20	18
Chlorobi	3722	2475	1220	5	76	37
Chloroflexi	3119	2217	1002	1194	1375	783
Cyanobacteria	762	511	395	719	148	301
Deferribacteres	1	1	1	4	4	1
Deinococcus-Thermus	15	20	5	1	1	0
Dictyoglomi	76	610	44	0	1	0
Elusimicrobia	17	41	10	0	3	1
Fibrobacteres	122	120	95	0	0	0
Firmicutes	10302	7279	4200	8044	13541	6788
Fusobacteria	16	21	14	0	0	0
Gemmatimonadetes	1573	1743	769	1302	2198	1098
Lentisphaerae	3	2	1	0	0	0
Nitrospirae	1655	1581	456	2037	2245	1422
Planctomycetes	2618	1422	608	827	1172	596
Proteobacteria	28513	22687	12379	14181	38200	18437
Spirochaetes	1506	63	64	16	43	20
Synergistetes	438	66	140	4	16	7
Tenericutes	3550	2701	1730	11	4	4
Thermodesulfobacteria	8	7	6	7	2	6
Thermotogae	64	50	28	951	1561	843
Verrucomicrobia	10012	6976	3337	3740	4563	2646

## ANEXO 2

Tabela Complementar 2 – Análises sobre a composição bacteriana ao nível de filo de acordo com a abundância relativa e o *effect sizes* em amostras de solo/serapilheira coletadas em abril e outubro no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

	Abundância Relativa (%)		<i>Effect size</i>
	Abril	Outubro	
<i>Proteobacteria</i>	26,816	32,977	-6,161
<i>Acidobacteria</i>	6,782	12,668	-5,886
<i>Firmicutes</i>	9,186	13,213	-4,026
<i>Actinobacteria</i>	16,344	19,407	-3,063
<i>Thermotogae</i>	0,059	1,562	-1,502
<i>Nitrospirae</i>	1,558	2,656	-1,098
<i>Gemmatimonadetes</i>	1,723	2,142	-0,418
<i>Deferribacteres</i>	0,001	0,004	-0,003
<i>Lentisphaerae</i>	0,003	0,000	0,003
<i>Thermodesulfobacteria</i>	0,009	0,007	0,002
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,016	0,001	0,015
<i>Fusobacteria</i>	0,022	0,000	0,022
<i>Elusimicrobia</i>	0,029	0,001	0,028
<i>Chlamydiae</i>	0,053	0,032	0,021
<i>Aquificae</i>	0,063	0,000	0,063
<i>Fibrobacteres</i>	0,142	0,000	0,142
<i>Cyanobacteria</i>	0,704	0,543	0,160
<i>Synergistetes</i>	0,272	0,013	0,259
<i>Dictyoglomi</i>	0,307	0,000	0,307
<i>Spirochaetes</i>	0,688	0,036	0,652
<i>Planctomycetes</i>	1,960	1,208	0,752
<i>Chloroflexi</i>	2,674	1,560	1,113
<i>Chlorobi</i>	3,128	0,054	3,073
<i>Tenericutes</i>	3,366	0,008	3,357
<i>Verrucomicrobia</i>	8,572	5,099	3,474
<i>Bacteroidetes</i>	15,523	6,807	8,715

## ANEXO 3

Informações Complementares 1 – PERMANOVA com 500 permutações utilizada para testar os resultados obtidos pela Análise das Coordenadas Principais (PCoA) (IcomA – Figura 3A) e matriz de dissimilaridades utilizada na construção do dendograma da Figura 3B (IcomB), ambos obtidos a partir de comunidades bacterianas (a nível de filo) de amostras de solo/serapilheira coletadas em abril e outubro no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

## IComA

<i>Parameter</i>	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>Sequential Sums of Squares</i>	F	<i>p-value</i>
Mês	1	0,217	6,333	0,092
Residuals	4	0,137		

## IComB

	MGA1	MGA2	MGA3	MGO4	MGO5
MGA2	0,248				
MGA3	0,116	0,159			
MGO4	0,256	0,202	0,201		
MGO5	0,205	0,279	0,219	0,146	
MGO6	0,282	0,199	0,211	0,065	0,166

## ANEXO 4

Tabela Complementar 3 – Coeficiente de correlação de Person, apurados a partir das interações entre os metadados e a OTU *table* obtidos a partir do sequenciamento *metabarcoding* do gene 16S rRNA em amostras do solo/serapilheira do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG).

Filos	P1	P2
<i>Acidobacteria</i>	-0,59	0,59
<i>Actinobacteria</i>	-0,09	0,09
<i>Aquificae</i>	0,87	-0,87
<i>Bacteroidetes</i>	0,76	-0,76
<i>Chlamydiae</i>	0,43	-0,43
<i>Chlorobi</i>	0,86	-0,86
<i>Chloroflexi</i>	0,62	-0,62
<i>Cyanobacteria</i>	0,38	-0,38
<i>Deferribacteres</i>	-0,71	0,71
<i>Deinococcus-, Thermus</i>	0,82	-0,82
<i>Dictyoglomi</i>	0,55	-0,55
<i>Elusimicrobia</i>	0,75	-0,75
<i>Fibrobacteres</i>	0,99	-0,99
<i>Firmicutes</i>	-0,37	0,37
<i>Fusobacteria</i>	0,97	-0,97
<i>Gemmatimonadetes</i>	-0,19	0,19
<i>Lentisphaerae</i>	0,87	-0,87
<i>Nitrospirae</i>	-0,59	0,59
<i>Planctomycetes</i>	0,49	-0,49
<i>Proteobacteria</i>	-0,14	0,14
<i>Spirochaetes</i>	0,47	-0,47
<i>Synergistetes</i>	0,67	-0,67
<i>Tenericutes</i>	0,93	-0,93
<i>Thermodesulfobacteria</i>	0,52	-0,52
<i>Thermotogae</i>	-0,92	0,92
<i>Verrucomicrobia</i>	0,61	-0,61