

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

JOSÉ PETRÔNIO MENDES JÚNIOR

**MICROBIOMA DA RIZOSFERA DE HIPERACUMULADORAS DE NÍQUEL
ENDÊMICAS DE SOLOS ULTRAMÁFICOS**

RECIFE

2024

José Petrônio Mendes Júnior
Engenheiro Agrônomo

**Microbioma da rizosfera de hiperacumuladoras de níquel endêmicas de solos
ultramáficos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Orientadora:

Prof.^a Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Coorientadores:

Prof. Clístenes Williams Araújo do Nascimento

Prof. Arthur Prudêncio de Araújo Pereira

Dr. Felipe José Cury Fracetto

Recife

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M538m Mendes, José Petrônio Mendes Júnior
Microbioma da rizosfera de hiperacumuladoras de níquel endêmicas de solos ultramáficos / José Petrônio Mendes Júnior Mendes. - 2024.
97 f. : il.

Orientadora: Giselle Gomes Monteiro Fracetto.
Coorientador: Clístenes Williams Araujo do Nascimento.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, 2024.

1. Microbioma. 2. Rizosfera. 3. Hiperacumuladoras de níquel. 4. 16S rRNA. 5. Solos Ultramáficos. I. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro, orient. II. Nascimento, Clístenes Williams Araujo do, coorient. III. Título

CDD 631.4

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

JOSÉ PETRÔNIO MENDES JÚNIOR

**Microbioma da rizosfera de hiperacumuladoras de níquel endêmicas de solos
ultramáficos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Aprovada em 08 de fevereiro de 2024

Prof.^a Dr.^a Giselle Gomes Monteiro Fracetto
Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lucas William Mendes
Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP)

Prof. Dr. Arthur Prudêncio de Araújo Pereira
Universidade Federal do Ceará

Dr. Felipe Martins do Rêgo Barros
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo

Dr. Fernando Bruno Vieira da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

DEDICATÓRIA

As matriarcas da minha família:

Maria de Lourdes Alves de Barros (*in memoriam*)

Creuza de Lima Mendes

Maria de Lourdes Mendes Silva (*in memoriam*)

Jozinete de Alves de Barros Mendes

Vocês são meu exemplo de força e resiliência. Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita bondade e misericórdia.

Ao Governo do Brasil e seus órgãos de fomento à pesquisa, em especial a CAPES, CNPQ e FACEPE. Sem a concessão das bolsas seria impossível se manter nessa jornada

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por todo acolhimento e políticas de assistência estudantil que me fizeram alcançar as oportunidades de educação superior pública e de qualidade.

Aos meus orientadores Prof.^a Giselle Gomes Monteiro Fracetto e Prof. Felipe José Cury Fracetto que sempre me incentivaram, apostaram no meu potencial e confiaram em mim antes mesmo que eu confiasse. Obrigado por todos os anos de convivência e aprendizado. Vocês são meu espelho. Jamais esquecerei de tudo que fizeram por mim.

Ao Prof. Lucas Mendes e toda equipe do curso de Bioinformática do CENA da USP pela disponibilidade e prestatividade em ensinar as análises de bioinformática.

Ao Dr Felipe Martins que desde o seu mestrado tem me ensinado e sido referência para meu crescimento profissional e intelectual. Obrigado por toda ajuda.

Aos membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia do Solo pelos bons momentos, convívio e conhecimentos trocados.

A Mária do Socorro e Vânia que tornaram os dias com os cafés da tarde em momentos de alívio. Obrigado por todos os abraços trocados e o repouso que encontrei em suas palavras.

A toda minha família. Meus pais, Jozinete e Petrônio, que investiram no maior bem que poderiam me dar, a educação, mesmo não tendo sido plenamente proporcionada a vocês quando jovens. A meu irmão, Pércles Mendes, pelos conselhos dados. A minha irmã, Mariana Mendes, que dividiu os dias, os momentos de fraqueza, os momentos de insegurança e com toda sua alegria me dizia “vai dar certo”. Vocês são minha luz.

A minha avó e a minha tia, Creuza Mendes e Lúcia Mendes, as mulheres mais fortes que já conheci. As histórias de vida que vocês me contaram no terraço da praia serviram de combustível para que cada vez que o desânimo me alcançasse, eu lembrasse que a superação exige momentos difíceis. Jamais terei como agradecer tudo que foi abdicado em prol da educação que me foi dada. Vocês me motivam a lutar todos os dias. Obrigado por acreditar juntamente comigo que a educação pode mudar vidas. Dedico cada conquista alcançada a vocês. Amo vocês.

A minha avó, Maria de Lourdes (*in memorian*), o seu puro amor será sempre lembrado por mim. Tenho certeza que você cuida de mim todos os dias daí do céu. Você estará sempre viva em meu coração.

Ao meu avô, Manoel Mariano Mendes (*in memorian*), que não conheci, mas sempre é e será lembrado como um bom homem. Suas memórias me inspiram.

As minhas amigas-irmãs Maria Emanuelle e Glêvia Kamila que foram minha companhia, braço direito e conselheiras de todos os momentos. Vocês não só tornaram meus dias mais leves como também me ressignificaram o amor e a confiança. Quero vocês e minha vida para sempre.

A todos os aqueles me ensinaram e contribuíram, ainda que indiretamente, para meu crescimento profissional e pessoal.

*“Sou tão pequena – disse a toupeira.
É verdade – concordou o menino -, mas faz uma grande diferença.”*

O menino, a toupeira, a raposa e o cavalo, de Charlie Mackesy

Microbioma da rizosfera de hiperacumuladoras de níquel endêmicas de solos ultramáficos

RESUMO GERAL

O complexo ultramáfico em Niquelândia, Goiás, abriga a maior reserva de níquel do Brasil e é o lar de espécies vegetais endêmicas capazes de acumular mais de 1000 mg kg⁻¹ de Ni nas folhas, conhecidas assim como hiperacumuladoras de níquel. O microbioma rizosférico desempenha um papel fundamental na adaptação das plantas ao ambiente, atuando como um amplificador. O objetivo deste estudo foi investigar o microbioma da rizosfera das espécies vegetais hiperacumuladoras de níquel *Justicia lanstykii* e *Lippia lupulina* endêmicas do complexo ultramáfico de Niquelândia. Realizou-se o sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA para investigar o microbioma associado a rizosfera das espécies vegetais hiperacumuladoras de níquel *Justicia lanstykii* e *Lippia lupulina* endêmicas do complexo ultramáfico de Niquelândia, bem como do solo adjacente a essas plantas. Nossos resultados revelaram diversidade significativa de filos. As amostras de solo adjacente à rizosfera revelaram predominância dos filos Acidobacteriota (23,5%), Spirochaetota (19%) e Chloroflexota (15,93%). Na rizosfera de *J. lanstykii*, os principais filos associados foram Actinobacteriota (35,57%), Acidobacteriota (25,5%) e Verrucomicrobiota (17,97%), enquanto em *L. lupulina*, foram Actinobacteriota (34,73%), Acidobacteriota (21,07%) e Verrucomicrobiota (13,17%). Este estudo destacou não apenas a diversidade e a estrutura desses microbiomas, mas também ressaltou o enriquecimento notável na rizosfera de ambas espécies em relação ao solo adjacente, bem como a formação de interações mais complexas de redes microbianas no nicho rizosférico.

Palavras-chave: 16S rRNA. Sequenciamento de amplicons. Illumina. Solos serpentinos. Rizosfera. Bioinformática.

Microbiome of rizosphere of the nickel hyperaccumulators *Lippia lupulina* and *Justicia lanstyakii* endemic to the ultramafic soils of Niquelândia

GENERAL ABSTRACT

The ultramafic complex in Niquelândia, Goiás, harbors Brazil's largest nickel reserve and is home to endemic plant species capable of accumulating over 1000 mg kg⁻¹ of Ni in leaves, known as nickel hyperaccumulators. The rhizospheric microbiome plays a crucial role in plant adaptation to the environment, acting as an amplifier. This study aimed to investigate the rhizosphere microbiome of the nickel hyperaccumulator plant species *Justicia lanstyakii* and *Lippia lupulina* endemic to the Niquelândia ultramafic complex. Amplicon sequencing of the 16S rRNA gene was conducted to investigate the microbiome associated with the rhizosphere of these plant species, as well as the adjacent soil. Our results revealed significant diversity of phyla. Soil samples adjacent to the rhizosphere showed a predominance of the phyla Acidobacteriota (23.5%), Spirochaetota (19%), and Chloroflexota (15.93%). In the rhizosphere of *J. lanstyakii*, the main associated phyla were Actinobacteriota (35.57%), Acidobacteriota (25.5%), and Verrucomicrobiota (17.97%), while in *L. lupulina*, they were Actinobacteriota (34.73%), Acidobacteriota (21.07%), and Verrucomicrobiota (13.17%). This study highlighted not only the diversity and structure of these microbiomes but also emphasized the notable enrichment in both species' rhizospheres compared to adjacent soil, as well as the formation of more complex microbial network interactions in the rhizospheric niche.

Keywords: 16S rRNA. Amplicon sequencing. Illumina. Serpentine soils. Rhizosphere. Bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Índices de diversidade alpha para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e do solo adjacente.48
- Figura 2.** Abundância relativa percentual a nível de filo para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.50
- Figura 3.** Abundância relativa percentual a nível de classe para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.51
- Figura 4.** Abundância relativa percentual a nível de ordem para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.52
- Figura 5.** Abundância relativa percentual a nível de família para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.54
- Figura 6.** Análise de heatmap por classe (A) e família (B) de acordo com as abundâncias de acordo com as amostras ambientais para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente....55

Figura 7. Análise de PCoA (Principal Coordinates Analysis) utilizando a distância de Bray-Curtis nos dados de abundância de acordo com as amostras ambientais para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente..... 57

Figura 8. Desdobramentos de um modelo de random forest com 500 árvores empregado na classificação do microbioma de amostras de solo conforme sua origem de acordo com as amostras ambientais para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e do solo adjacente. 60

Figura 9. Visualização gráfica da eficácia do modelo Random Forest com 500 árvores empregado na classificação do microbioma de amostras de solo conforme sua origem de acordo com as amostras ambientais para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e do solo adjacente. 60

Figura 10. Gráficos da análise de network gerados a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos a partir de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*. 63

Figura 11. Gráfico de dispersão das abundâncias relativas das enzimas gerados a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos a partir de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*. 64

Figura 12. Gráfico de heatmap contendo as 50 funções mais abundantes identificadas pelo PICRUST e as respectivas abundâncias relativas por amostra a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de

rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*..... 65

Figura 13. Gráfico de barras empilhadas contendo as 30 funções mais abundantes identificadas pelo PICRUSSt e as respectivas abundâncias relativas por amostra a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*..... 66

Figura 14. Vias metabólicas das 30 principais enzimas identificadas pelo PICRUSSt a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*..... 69

Figura 15. Abundância relativa proporcional percentual das enzimas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos do carbono, metano, nitrogênio, fósforo e enxofre identificadas pelo PICRUSSt a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies das plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*. 70

Figura 16. Heatmap das principais vias identificadas para os ciclos biogeoquímicos do carbono, metano, nitrogênio, fósforo e enxofre identificadas pelo PICRUSSt a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies das plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*..... 72

Figura 17. Agrupamento gráfico da qualidade das sequências forward obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 89

Figura 18. Agrupamento gráfico da qualidade das sequências reverse obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 89

Figura 19. Agrupamento gráfico da qualidade das sequências forward obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq após o procedimento de trimagem para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 90

Figura 20. Agrupamento gráfico da qualidade das sequências reverse obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq após o procedimento de trimagem para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 90

Figura 21. Taxas de erro transicionais observadas e estimadas para as sequências forward obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq após o procedimento de trimagem para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 91

Figura 22. Taxas de erro transicionais observadas e estimadas para as sequências reverse obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq após o procedimento de trimagem para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 91

Figura 23. Curva de rarefação usando a abordagem por ASVs avaliada por espécies e tamanho de amostral obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 94

Figura 24. Curva de rarefação usando a abordagem por OTUs avaliada por família e tamanho de amostral obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 94

Figura 25. Curvas de rarefação das amostras visualizadas de acordo com a diversidade observada, índice Chao1 e ACE dos dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA por etapas do procedimento de análise de acordo com a ferramenta bioinformática utilizada para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 94

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Atributos químicos e físicos dos solos ultramáficos da Niquelândia (Cambissolo) (VIEIRA LIMA, 2023). 44
- Tabela 2.** Valores dos índices de diversidade alfa para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e do solo adjacente. 49
- Tabela 3.** Parâmetros topológicos e propriedades da network do microbioma dos solos ultramáficos de Niquelândia. 62
- Tabela 4.** Estatísticas descritivas das abundâncias relativas das enzimas gerados a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos a partir de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*. 64
- Tabela 5.** Descrição das funções, substratos e produtos das 30 principais enzimas identificadas pelo PICRUSt a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*. 67
- Tabela 6.** Metadados de identificação e descrição do sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 87
- Tabela 7.** Metadados acerca da qualidade das sequências obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de

hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia.
..... 87

Tabela 8. Descrição do processamento dos dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA por etapas do procedimento de análise de acordo com a ferramenta bioinformática utilizada para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia. 93

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
Referências Bibliográficas	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Introdução ao microbioma vegetal e sua importância	23
2.2 Solos ultramáficos e sua importância para a flora endêmica	24
2.3 Flora endêmica e sua importância para a biodiversidade	24
2.4 Solo ultramáfico como modulador do microbioma de plantas	25
2.5 O papel do microbioma na adaptação de plantas a solos ultramáficos	26
2.6 O microbioma como agente regulador da aquisição de elementos pelas plantas	26
2.7 O microbioma como agente protetor das plantas contra patógenos.....	27
2.8 Técnicas utilizadas para estudar o microbioma de plantas	28
Referências Bibliográficas	31
3. MICROBIOMA DA RIZOSFERA DE HIPERACUMULADORAS DE NÍQUEL ENDÊMICAS DE SOLOS ULTRAMÁFICOS	37
Resumo.....	37
Abstract	39
3.1 Introdução	40
3.1 Hipóteses.....	42
3.2 Objetivos	43
3.2.1 Objetivo geral.....	43
3.2.2 Objetivos específicos	43
3.3 Material e Métodos	44
3.3.1 Seleção das espécies de plantas	44
3.3.2 Descrição do local de coleta das amostras de solo.....	44
3.3.3 Coleta e extração do DNA das amostras de solo	45
3.3.4 Amplificação e sequenciamento das amostras de solo	45
3.3.4 Análise de bioinformática com os dados de sequenciamento das amostras de solo.....	45
3.3.5 Análises estatísticas dos resultados de sequenciamento das amostras de solo	46
3.3.6 Análise de Random Forest	46
3.3.7 Análise de network.....	46

3.3.8 Análise de predição funcional do metagenoma.....	47
3.4 Resultados.....	48
3.4.1 Análise de alpha diversidade do microbioma.....	48
3.4.3 Análise da composição do microbioma.....	49
3.4.3 Análise de beta diversidade do microbioma.....	56
3.4.4 Modelo de Random Forest	58
3.4.4 Análise de network	62
3.4.5 Análise de predição funcional do metagenoma.....	64
3.5 Discussão	73
3.6 Conclusões.....	78
Referências Bibliográficas.....	79
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
APÊNDICE A - Pré-processamento dos dados	87

1. INTRODUÇÃO GERAL

Rochas ultramáficas são compostas por menos de 45% de SiO₂, bem como possuem predominância de minerais ferromagnesianos que podem conter altos teores de metais pesados, como níquel, cobalto, cromo e ferro. O intemperismo de rochas ultramáficas com teores de metais pesados acima dos níveis de fundo naturais determinados pela legislação local (no Brasil, a resolução CONAMA nº 420/2010) resultam na formação dos solos ultramáficos (CONAMA, 2009).

Sítios ultramáficos já foram encontrados em diversos lugares do mundo como: Grécia, África do sul, Alpes Italianos, França, Portugal, Espanha, Camarões, Marrocos, Zimbábue, Índia, Sri Lanka, Costa Rica, Nova Caledônia, Nova Zelândia, Indonésia, Japão e Brasil. Contudo, representam uma pequena parcela da superfície terrestre, cerca de 1%. No Brasil, esse tipo de solo já foi registrado nos seguintes municípios: Pedra Branca (CE), Limoeiro (PE), Caraíba (BA), Santa Rita (PB), Boa Vista (RO), Americano do Brasil (GO) e Niquelândia (GO) (BOCKHEIM, 2014).

Solos ultramáficos apresentam propriedades únicas e que são abordadas por alguns cientistas como “fatores ultramáficos”. Em resumo, as principais características ultramáficas são: elevadas concentrações de metais pesados e/ou metaloides; baixas concentrações de elementos como cálcio (Ca), nitrogênio (N), potássio (K), fósforo (P), molibdênio (Mo) e boro (B); desbalanço das proporções da relação cálcio-magnésio (Ca:Mg) (KIERCZAK; PIETRANIK; PEĐZIWIATR, 2021). Essas propriedades são recorrentes nesses ambientes e responsáveis pelo endemismo edáfico de algumas espécies, que é a restrição da ocorrência devido sua alta afinidade com o local e os solos de origem (COELHO; GONÇALVES; ROMANO, 2020).

O termo endemismo edáfico (ou fator edáfico) se refere à ocorrência de espécies que são exclusivas de uma determinada região ou área. Solos possuem características próprias que derivam de cinco fatores de formação: clima, organismos, topografia, tempo e o material parental. Atualmente, ecólogos do solo reconhecem o papel do material parental (a rocha) como o principal fator para a formação da diversidade, ocorrência e distribuição de espécies. Como solos ultramáficos derivam de rochas ultrabásicas, e estas por sua vez são o fator principal para a formação desses sítios, o endemismo edáfico nesses ambientes é imputado a elas. Como mencionado, os componentes do fator edáfico afetam a sobrevivência de espécies vegetais e da sua biota associada. Contudo, essa restrição não implica em ambientes estéreis.

Apesar das características de solos ultramáficos descreverem um ambiente edáfico impróprio ao cultivo de espécies agrícolas comuns, esses solos abrigam grande potencial biotecnológico, a exemplo para o uso da tecnologia de agromineração. A agromineração envolve o cultivo de espécies de plantas hiperacumuladoras de metais para colheita da biomassa e posterior incineração a fim de recuperar os metais alvo ou sais. Vários elementos podem ser recuperados com o uso dessa tecnologia de cultivo como, por exemplo: cádmio (Cd), manganês (Mn), níquel (Ni), tálio (Tl) e o zinco (Zn). Contudo, a maioria das pesquisas tem focado no desenvolvimento da agromineração do Ni.

A agromineração depende da capacidade de espécies vegetais hipertolerantes a metais acumularem em seus tecidos concentrações incomuns de metais pesados. A esse grupo vegetal damos o nome de hiperacumuladoras de metais pesados. Tais plantas absorvem um ou mais metais pesados sem apresentarem sintomas de fitotoxicidade. Três características principais as distinguem das demais: elas podem absorver metais pesados em um ritmo mais rápido que a maioria das plantas superiores; podem transportar esses metais das raízes para os brotos rapidamente; e podem desintoxicar e armazenar esses metais em suas folhas. Apesar de tais vantagens, existem alguns desafios envolvendo a busca por plantas hiperacumuladoras de metais pesados, que são: elas possuem crescimento lento e baixa biomassa, o que limita seu uso em muitos casos; podem não conseguir acumular todos os metais pesados, pois alguns destes podem também ser tóxicos para elas; e seus mecanismos de hiperacumulação ainda não são completamente compreendidos, o que exige mais pesquisas.

As plantas utilizadas para agromineração são capazes de acumular metais pesados em seus tecidos devido à presença de micro-organismos que modulam seu metabolismo para adaptação em ambientes com alta concentração de metais. A associação planta-microbioma pode abrigar micro-organismos promotores de crescimento de plantas dotados de mecanismos como: fixação biológica de nitrogênio, solubilização e/ou mineralização de fosfatos, produção de fitohormônios, produção de substâncias antibióticas, formação de biofilme e outras.

A essa comunidade de micro-organismos intimamente relacionada às plantas chamamos de microbioma. Microbioma de plantas é o conjunto de micro-organismos (como bactérias, fungos e archaeas) que habitam as raízes, caules, folhas e frutos das plantas. O microbioma de plantas é um ecossistema complexo que desempenha um papel fundamental em diversos processos biológicos das plantas. Ele é essencial para processos biológicos diversos e, em plantas hiperacumuladoras de metais, micro-organismos específicos do microbioma das raízes interagem com metais pesados no solo e auxiliam sua absorção seletiva pelas plantas. Essa relação entre as plantas hiperacumuladoras e seus micro-organismos pode fornecer *insights*

valiosos para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação, restauração ambiental e ainda agromineração.

Duas espécies de plantas endêmicas de um sítio ultramáfico situado na Niquelândia foram caracterizadas como hiperacumuladoras de níquel, *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii*. Contudo, não existem registros sobre seu microbioma. Estudar a composição das comunidades microbianas e as associações com as respectivas espécies, configura um importante passo para compreender o papel do microbioma das plantas em solos ultramáficos, bem como seus potenciais usos na biotecnologia.

Referências Bibliográficas

BOCKHEIM, J. G. **Soil Geography of the USA: A Diagnostic-Horizon Approach**. 1st ed. 2014. Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06668-4>.

COELHO, N.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Endemic Plant Species Conservation: Biotechnological Approaches. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 345, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9030345>.

CONAMA, C. N. do M. A. (CONAMA). Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. p. 81–84, 28 dez. 2009. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/wp-content/uploads/sites/17/2017/09/resolucao-conama-420-2009-gerenciamento-de-acs.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2024.

KIERCZAK, J.; PIETRANIK, A.; PEŹDZIWIATR, A. Ultramafic geoeosystems as a natural source of Ni, Cr, and Co to the environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 755, p. 142620, fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142620>.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Introdução ao microbioma vegetal e sua importância

Apesar de toda tecnologia desenvolvida, atualmente não existe uma definição consenso sobre microbioma. As tentativas de definição, até então, não se adequaram de forma abrangente o suficiente para todas as áreas da ciência que pesquisam sobre esse tema (BERG et al., 2020). Entretanto, dentro da ecologia microbiana, o termo é usado para significar todos os micro-organismos de uma comunidade que ocupam um habitat razoavelmente bem definido, abrangendo seu “teatro de atividade” (BERG et al., 2020; WHIPPS; LEWIS; COOKE, 1988).

Solos possuem a maior diversidade microbiana da superfície terrestre (BULGARELLI et al., 2013; DONG et al., 2019). É a partir do solo que as plantas recrutam seu microbioma da rizosfera (rizobioma), ou seja, o rizobioma é um subconjunto das comunidades microbianas do solo (BERG et al., 2020; SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018).

Sendo a modulação do microbioma das plantas sujeita a fatores comuns e específicos. Os fatores comuns são aqueles que são gerais e recorrentes na formação dos microbiomas das plantas como um todo, sendo eles: os micro-organismos previamente presentes, os nutrientes do solo, a morfologia e a fisiologia da raiz. Os fatores específicos, por sua vez, englobam aspectos relacionados as especificidades do genótipo vegetal e sua relação com as moléculas sinalizadoras e proteínas de transporte trocadas (SASSE; MARTINOIA; NORTHEN, 2018). A estratégia vegetal de hiperacumulação não é o fator preponderante para a formação do microbioma vegetal. A espécie e taxonomia são os fatores mais correlacionados com o recrutamento do microbioma, sendo relatado que apenas *Rhodococcus* e *Sphingomonas* seriam mais abundantes na rizosfera de plantas hiperacumuladoras de níquel (ANCOUSTURE et al., 2023).

O microbioma vegetal representa um *continuum* de interações ecológicas variando desde comensais a mutualísticas. Os componentes do microbioma atuam como amplificadores da capacidade das plantas para a adaptação ambiental (BULGARELLI et al., 2013). Portanto, compreender de forma holística as funções do microbioma configura uma possível estratégia para adaptar plantas específicas a uma dada finalidade, como a agromineração e fitorremediação.

2.2 Solos ultramáficos e sua importância para a flora endêmica

A formação e desenvolvimento de solos ultramáficos acarreta a seleção de espécies vegetais endêmicas que adaptadas às condições ambientais que seriam consideradas extremas para a maioria das plantas superiores. As espécies vegetais que se desenvolvem nesses ambientes devem ser capazes de sobreviver a condições como: baixos níveis de nutrientes, altos teores de magnésio e baixos teores de cálcio que culminam em uma relação Ca:Mg baixa, bem como altos teores disponíveis de metal(oides) como níquel (Ni), cromo (Cr) e cobalto (Co) (DALRYMPLE; WHITTAKER, 2022).

Em solos ultramáficos, táxons endêmicos são capazes de sobreviver com até 25% a menos de cálcio comparado com plantas não endêmicas desses ambientes, sugerindo uma capacidade de autorregulação interna dos níveis de cálcio. Além disso, a densidade de plantas nessas áreas pode refletir na predominância de ecótipos endêmicos ou ecótipos tolerantes. Um aumento de 30% na densidade de cobertura vegetal nesses ambientes propicia o favorecimento de interações, menor pressão de herbivoria, acentua o intemperismo biológico e aumenta a capacidade de retenção de água em virtude do desenvolvimento do solo (SIANTA; KAY, 2019).

Entre as espécies endêmicas de solos ultramáficos estão as plantas hiperacumuladoras de metais pesados. O termo “hiperacumuladora” foi dado devido a capacidade dessas espécies vegetais absorverem ativamente grandes quantidades de um ou mais metais do solo. Estimam-se 450 espécies de plantas catalogadas como hiperacumuladoras de metais pesados no mundo, sendo 75% dessas espécies hiperacumuladoras de níquel. Tais espécies acumulam mais de 1000 mg kg⁻¹ (0,1%) de níquel em seus órgãos aéreos sem sofrer danos fitotóxicos (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011).

2.3 Flora endêmica e sua importância para a biodiversidade

A biodiversidade de plantas já foi relacionada com o aumento da riqueza e diversidade de espécies em níveis tróficos superiores, bem como atuantes na seleção dos hospedeiros mediante a exsudação de alcaloides e compostos fenólicos que alteram as redes de interação (SCHUMAN et al., 2016).

Dalrymple e Whittaker (2022), classificaram espécies vegetais endêmicas de solos ultramáficos como “serpentinhas”, devido as suas características adaptativas comuns para esses

ambientes considerados hostis. Hallikma et al. (2023) relataram em seu estudo que uma maior biodiversidade de espécies de plantas é fundamental para proteção do ecossistema local, bem como para proporcionar um equilíbrio das interações ecológicas que asseguram a estabilidade ambiental.

Nascimento et al. (2022) associam o alto endemismo em ambientes ultramáficos como resultado do processo evolutivo e que deve ser preservado a fim de assegurar que os genótipos possam ser utilizados para pesquisa antes que sejam extintos. Além do uso em estudos que relacionam à tolerância a metais, os autores apontam a potencialidade de espécies hiperacumuladoras para revegetação e recuperação de terras minadas, remediação de solos poluídos por metais, biofortificação de culturas com micronutrientes e fitominação de solos enriquecidos com Ni ou substratos.

2.4 Solo ultramáfico como modulador do microbioma de plantas

A estrutura das comunidades microbianas do solo tem preditores abióticos. Os principais fatores abióticos que conduzem a modulação do microbioma do solo são: o pH, a matéria orgânica, o teor de nutrientes e o tipo de solo (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013). Outros fatores já foram relacionados à estrutura das comunidades microbianas no solo como: o tempo de cultivo, as práticas de manejo, variações sazonais na abundância e o histórico da área (BARROS et al., 2018; JORQUERA et al., 2014; ORR et al., 2015; SEUFERT, 2019; SISTI et al., 2004)

Hao et al. (2021) descreveram que a ocorrência de micro-organismos em nichos ultramáficos é resultado de um processo de adaptação e seleção, tendo como mecanismos de adaptação: expulsão de espécies metálicas da superfície da célula, biotransformação de metais em formas menos tóxicas, adsorção de metais à parede celular, exclusão, depuração ativa, bioadsorção, precipitação e bioacumulação intracelular e extracelular. Os padrões de distribuição para regulação de genes do perfil funcional que se relacionam com sítios ultramáficos apresentaram maiores valores para resistência a cromo e ferro (*ceuE* e *chrA*), resistência ao arsênico (*asrR*, *acr3* e *arsC*), solubilização de fosfatos (*ppa* e *ppx*) e síntese de Ácido Indol-3-Acético (AIA) regulado pelo gene *aldH* (SENTHIL KUMAR et al., 2023). Tais resultados indicam que possivelmente as interações benéficas adaptativas entre planta-microbioma mais bem sucedidas para colonização de ambientes edáficos partiriam de mecanismos relacionados a tais genes.

2.5 O papel do microbioma na adaptação de plantas a solos ultramáficos

A colonização primária de rochas ultramáficas foi elucidada como um processo concomitantemente exercido por archaeas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato. As comunidade procarióticas associadas ao processo de intemperismo de rochas ultramáficas seria então composta por: *Methanobacteriales*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacter* e *Chloroflexi* e outras bactérias pertencentes ao classe *Gammaproteobacteria* (RATTRAY et al., 2022). Assim, o microbioma dos solos ultramáficos seria herança das comunidades primitivas associadas às rochas formadoras dos solos desses ambientes.

Apesar dos estudos envolvendo ecossistemas ultramáficos serem recentes, os resultados encontrados até o momento são de grande importância, pois atrelam a ocorrência e sobrevivência de espécies vegetais ao microbioma. Já foi verificado que a proteína de ligação *ceuE* de *Campylobacter* junto com o transportador de cromato *chrA*, estão envolvidos na resistência ao estresse de metais como Cr e Fe funcionando como uma bomba de efluxo mediada por sideróforos na zona rizosférica. Além disso, observou-se que a abundância da enzima ALDH, que regula a síntese de AIA, contribui para eliminação de Espécies Reativas ao Oxigênio (ERO) desencadeando mudanças no metabolismo celular da planta funcionando como um processo de desintoxicação de metais (SENTHIL KUMAR et al., 2023; SHAH; MATHUR; HAZRA, 2021).

Nagarajan et al. (2022) reafirmam a existência de um sistema de bomba de efluxo de metais pesados, relacionando a rizosfera, rizoplano e endosfera de *Biden pilosa* de um nicho ultramáfico em Taiwan a genes como: *chrA* (transportador de cromato), *arsH* (proteína de resistência ao arsênico) e *cbiO*, *cbiM*, *cbiN* (proteína permeasse do sistema de transporte de cobalto/níquel). Além disso, os autores relacionaram a rizosfera de solos ultramáficos a gêneros bacterianos como: MND1, *Ellin6067*, *Vicinamibacteriaceae*, *Gaiella*, *Actinobacteria* e *Chloroflexi*.

2.6 O microbioma como agente regulador da aquisição de elementos pelas plantas

Pantigoso, Newberger e Vivanco (2022) revisaram os efeitos da inoculação de microorganismos benéficos na aquisição de nutrientes. Os autores discutem que corretivos orgânicos devem ser estudados a fim de modular os voláteis produzidos pelo sistema radicular para

alcançar efeitos de nutrição, biocontrole e antiestresse. Apesar de concordarem quanto aos efeitos da inoculação de Promotores de Crescimento de Plantas (PCP), os autores reiteram que algumas espécies possuem uma microbiota associada definida (gnobióticos) e que apresenta restrições competitivas em ambientes agrícolas, sendo inviável inclusive a síntese de organismos devido à dificuldade em importar qualidades genéticas sem afetar o balanço energético dos organismos.

A inoculação com PCP é capaz de aumentar a aquisição de nutrientes em espécies cultiváveis, refletir em efeitos associativos com FMA (Fungos Micorrízicos Arbusculares) e alterar a estrutura do microbioma da rizosfera (ELTLBANY et al., 2019). A inoculação de PCP isolados de plantas nativas já foi verificado como alternativa de sucesso para aquisição de nutrientes e alívio do estresse (RAJ et al., 2023).

Apesar dos avanços nos estudos envolvendo microbiologia, a literatura sobre os efeitos da inoculação de PCP na aquisição de nutrientes em áreas de solos ultramáficos são incipientes. Atualmente, grande parte dos estudos tem focado na compreensão sobre a composição do microbioma de ambientes ultramáficos. Dessa forma, o que sabemos até então é da existência de um microbioma composto por uma colonização multifásica de generalistas, especialistas endêmicos e sobreviventes que se adaptaram as condições oligotróficas (DION, 2022).

2.7 O microbioma como agente protetor das plantas contra patógenos

Koner et al. (2023) verificaram que *Proteobacteria* e *Bacteroidota* foram os grupos encontrados em maior abundância em solos ultramáficos em comparação com não ultramáficos, bem como *Propionibacteriales* e *Actinobacteriota* apresentaram maior riqueza. Ademais, os autores não encontraram variância significativa de bactérias específicas em amostras de rochas ultramáficas, solos ultramáficos e rizosfera quando comparadas aos materiais de estudo não ultramáficos adjacentes.

Avaliando a diversidade bacteriana em acessos de *Nocacea caerulescens* (espécie hiperacumuladora de níquel) em solo ultramáfico e não ultramáfico, verificou-se que as diferenças composicionais relativas à biodiversidade também eram insignificantes. Entretanto, a abundância de *Actinobacteria* mostrou aumento significativo entre as áreas (VISIOLI et al., 2019). Portanto, a biodiversidade rizosférica de hiperacumuladoras de níquel estaria associada a fatores que envolvem o genótipo vegetal, havendo influência do tipo de solo sobre o qual se desenvolvem apenas em termos de abundância.

As flutuações dos níveis de abundância de determinados grupos bacterianos decorrem dos fatores edáficos que tendem a favorecer grupos k-estrategistas em detrimento dos r-estrategistas em sítios ultramáficos (RAJAKARUNA; BOYD, 2019; SIANTA; KAY, 2019). Tal condição é resultado da restrição da disponibilidade de nutrientes, como o carbono (C), que é essencial para a que haja o aumento da biomassa microbiana do solo (FORNARA et al., 2018; WU et al., 2019).

Como consequência, as alterações na abundância de r-estrategistas contribuem para o desenvolvimento de superpopulações de oligotróficos (k-estrategistas) que possuem mecanismos de sobrevivência que muitas vezes envolvem interações negativas. Actinobactérias são reconhecidas como PCP multifuncionais, tendo como principal mecanismo de PCP a produção de antibióticos que auxiliam indiretamente o crescimento das plantas (MITRA et al., 2022).

Em uma revisão Erb (2018), relata a relação existente entre os voláteis e a supressão de doenças em plantas e a mediação do microbioma. A sinalização seria uma resposta ao indol produzido por rizobactérias que ativam a expressão de genes relacionados ao Jasmonato (JA), Metil Jasmonato (MeJA) e Ácido Azeálico (AAz) que resultam na ativação da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA). Entretanto, os autores reiteram a dificuldade em estabelecer como de fato funcionam as vias de sinalização em condições naturais devido à complexidade dos estudos envolvendo expressão de voláteis, bem como a identificação desses compostos.

Avaliar a composição do microbioma de plantas, seu perfil metabólico e suas possíveis funções ecossistêmicas é um passo fundamental para entender como ocorrem as interações e estabelecer uma forma de tratamento ambientalmente adequada para o melhor desenvolvimento dessas plantas. Bactérias de diversas classes já foram verificadas como PCP, a exemplo das pertencentes a *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Firmicutes* (RABARI et al., 2022). Tais classes já foram identificadas na rizosfera de algumas espécies hiperacumuladoras de níquel, o que sugere a participação do rizobioma dessas espécies como parte do sistema de defesa via Resistência Local Adquirida (RLA) (ANCOUSTURE et al., 2023; TOUCEDA-GONZÁLEZ et al., 2018).

2.8 Técnicas utilizadas para estudar o microbioma de plantas

Entre as principais técnicas moleculares utilizadas para investigar o microbioma, estão o Sequenciamento de *Amplicons* (SA) e o Sequenciamento Metagenômico (SM). O SA consiste

no sequenciamento de produtos de PCR de regiões hipervariáveis do genoma de membros específicos por meio da ligação seletiva de primers universais. Dessa forma, os genes comumente empregados nessa técnica são: o gene 16S rRNA de bactéria, o gene 16S rRNA de archaea, o gene 18S rRNA de eucariotos, regiões de espaçadores transcritos internos (ITS) e outros loci conservados (FRICKER; PODLESNY; FRICKE, 2019).

O SM, por sua vez, é uma abordagem de genoma completo. Para isso, os DNA presentes em uma amostra são fragmentados e posteriormente sequenciados. Diferentemente do SA, as leituras geradas por essa técnica podem corresponder a organismos de todos os domínios. Dessa forma, o volume de dados gerados é ainda maior, bem como os custos e as demandas de bioinformática (FRICKER; PODLESNY; FRICKE, 2019).

Com o advento do Sequenciamento de Última Geração (NGS), a necessidade por ferramentas que auxiliassem a analisar os dados gerados se tornou ainda maior. Nesse sentido, a bioinformática foi desenvolvida como aliada aos estudos ômicos (XU et al., 2023). Trata-se de um domínio interdisciplinar que associa estatística, química, engenharia, matemática e ciência da computação para resolver problemas biológicos (IQBAL; KUMAR, 2023). A profundidade dos dados e a capacidade de acessá-los por bioinformática permitiu o desenvolvimento aprofundado de estudos envolvendo a área ambiental (KUMARI et al., 2022).

O NGS permitiu o acesso a informações importantes sobre o microbioma de plantas hiperacumuladoras de metais pesados. Elucidar a composição, função e metabolismo de comunidades bacterianas presentes nesses ambientes é imprescindível para o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem processos como a fitorremediação e/ou fitominação. Verificou-se que plantas hiperacumuladoras de metais conservam uma microbiota rizosférica central distinta de plantas não hiperacumuladoras. Os táxons fundamentais na rizosfera de tais espécies guardam correlação entre sua abundância e o acúmulo de metal na parte aérea. Além disso, a inoculação de isolados pertencentes ao microbioma central podem servir de auxiliares ao crescimento vegetal e a tolerância aos metais (LUO et al., 2022).

A alta concentração de metais pesados é responsável por modular o microbioma de outras populações, como caracóis endêmicos de sítios ultramáficos, a fim de lidar com o estresse metálico. Dessa forma, o microbioma predominante realiza interações positivas reduzindo o efeito dos metais no organismo, auxiliando na manutenção da biodiversidade (ZHANG et al., 2022).

O tipo de solo é capaz de modular as comunidades bacterianas presentes na endosfera radicular, endosfera do caule e na endosfera foliar. Apesar de herdar um microbioma bacteriano constante, plantas podem além de carregar gerações endofíticas comuns em suas sementes,

apresentarem mudanças composicionais do microbioma mediante as mudanças no solo (DURAND et al., 2022).

Hou et al. (2021) avaliaram as mudanças cronológicas na comunidade bacteriana rizosférica de *Sedum plumbizincicola*. Os autores verificaram que a comunidade bacteriana rizosférica é responsiva a presença de metais, mas não é influenciada em termos de composição pela concentração. A concentração dos metais nos solos regula a atividade enzimática dos PCP. Dessa forma, a estabilização do microbioma rizosférico está relacionado ao estágio fenológico da planta. Gêneros como *Paenibacillus* e *Straptacidiphilus* foram positivamente correlacionados com a absorção de cádmio (Cd).

Apesar dos avanços envolvendo as tecnologias de NGS e as ferramentas de bioinformática disponíveis, as bases de dados apontam a inexistência de estudos sobre o microbioma dos sítios ultramáficos da Niquelândia. De igual modo, não há registros de avaliação sobre o microbioma das espécies de planta hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii*. Portanto, o presente trabalho trata-se de um estudo inédito envolvendo o microbioma de duas espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel endêmicas de Niquelândia e que demonstram aptidão para fitomineração e/ou fitorremediação.

Referências Bibliográficas

ANCOUSTURE, J.; DURAND, A.; BLAUDEZ, D.; BENIZRI, E. A reduced but stable core microbiome found in seeds of hyperaccumulators. **Science of The Total Environment**, v. 887, p. 164131, ago. 2023. DOI 10.1016/j.scitotenv.2023.164131. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969723027523>. Acesso em: 6 jun. 2023.

BARROS, F. M. do R.; FRACETTO, G. G. M.; FRACETTO, F. J. C.; MENDES JÚNIOR, J. P.; DE ARAÚJO, V. L. V. P.; LIRA JUNIOR, M. A. Silvopastoral systems drive the nitrogen-cycling bacterial community in soil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 3, p. 281–290, jun. 2018. DOI 10.1590/1413-70542018423031117. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542018000300281&lng=en&tlng=en.

BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T.; VERGÈS, M.-C. C.; CHARLES, T.; CHEN, X.; COCOLIN, L.; EVERSOLE, K.; CORRAL, G. H.; KAZOU, M.; KINKEL, L.; LANGE, L.; LIMA, N.; LOY, A.; MACKLIN, J. A.; MAGUIN, E.; MAUCLINE, T.; MCCLURE, R.; ... SCHLOTTER, M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 103, dez. 2020. DOI 10.1186/s40168-020-00875-0. Disponível em: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00875-0>. Acesso em: 3 maio 2023.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, abr. 2013. DOI 10.1146/annurev-arplant-050312-120106. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>. Acesso em: 9 maio 2023.

DALRYMPLE, S. E.; WHITTAKER, A. The Unique Flora of a “Mountain Summit at Sea Level”—Serpentine Debris on the Shetland Isles. **Imperiled: The Encyclopedia of Conservation**. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 282–290. DOI 10.1016/B978-0-12-821139-7.00072-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128211397000726>. Acesso em: 12 maio 2023.

DION, P. Microbiology of extreme soil environments. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. B9780128229743001099. DOI 10.1016/B978-0-12-822974-3.00109-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128229743001099>. Acesso em: 4 jun. 2023.

DONG, C.-J.; WANG, L.-L.; LI, Q.; SHANG, Q.-M. Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. **PLOS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0223847, nov. 2019. DOI 10.1371/journal.pone.0223847. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0223847>. Acesso em: 11 maio 2023.

DURAND, A.; LEGLIZE, P.; LOPEZ, S.; STERCKEMAN, T.; BENIZRI, E. *Noccaea caerulescens* seed endosphere: a habitat for an endophytic bacterial community preserved through generations and protected from soil influence. **Plant and Soil**, v. 472, n. 1–2, p. 257–278, mar. 2022. DOI 10.1007/s11104-021-05226-y. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11104-021-05226-y>. Acesso em: 23 jun. 2023.

ELTLBANY, N.; BAKLAWA, M.; DING, G.-C.; NASSAL, D.; WEBER, N.; KANDELER, E.; NEUMANN, G.; LUDEWIG, U.; VAN OVERBEEK, L.; SMALLA, K. Enhanced tomato plant growth in soil under reduced P supply through microbial inoculants and microbiome shifts. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 9, p. fiz124, set. 2019. DOI 10.1093/femsec/fiz124. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article/doi/10.1093/femsec/fiz124/5544364>. Acesso em: 24 maio 2023.

ERB, M. Volatiles as inducers and suppressors of plant defense and immunity — origins, specificity, perception and signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 117–121, ago. 2018. DOI 10.1016/j.pbi.2018.03.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526617301346>. Acesso em: 12 jun. 2023.

FORNARA, D. A.; OLAVE, R.; BURGESS, P.; DELMER, A.; UPSON, M.; MCADAM, J. Land use change and soil carbon pools: evidence from a long-term silvopastoral experiment. **Agroforestry Systems**, Netherlands, v. 92, n. 4, p. 1035–1046, ago. 2018. DOI 10.1007/s10457-017-0124-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10457-017-0124-3>.

FRICKER, A. M.; PODLESNY, D.; FRICKE, W. F. What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 105–112, set. 2019. DOI 10.1016/j.jare.2019.03.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123219300724>. Acesso em: 19 jun. 2023.

GRIFFITHS, B. S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 112–129, mar. 2013. DOI 10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x>. Acesso em: 16 maio 2023.

HALLIKMA, T.; TALI, K.; MELTS, I.; HEINSOO, K. How is plant biodiversity inside grassland type related to economic and ecosystem services: An Estonian case study. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 349, p. 108429, jun. 2023. DOI 10.1016/j.agee.2023.108429. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880923000889>. Acesso em: 15 maio 2023.

HAO, X.; ZHU, J.; RENSING, C.; LIU, Y.; GAO, S.; CHEN, W.; HUANG, Q.; LIU, Y.-R. Recent advances in exploring the heavy metal(loid) resistant microbiome. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 94–109, 2021. DOI

10.1016/j.csbj.2020.12.006. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037020305316>. Acesso em: 15 maio 2023.

HOU, J.; LIU, W.; LI, Y.; HUANG, Y.; CHRISTIE, P.; WU, L.; LUO, Y. Rhizosphere bacterial community dynamics of the cadmium hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* under a cadmium concentration gradient during phytoextraction. **Plant and Soil**, v. 468, n. 1–2, p. 375–388, nov. 2021. DOI 10.1007/s11104-021-05123-4. Disponível em:
<https://link.springer.com/10.1007/s11104-021-05123-4>. Acesso em: 23 jun. 2023.

IQBAL, N.; KUMAR, P. From Data Science to Bioscience: Emerging era of bioinformatics applications, tools and challenges. **Procedia Computer Science**, v. 218, p. 1516–1528, 2023. DOI 10.1016/j.procs.2023.01.130. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877050923001308>. Acesso em: 19 jun. 2023.

JORQUERA, M. A.; MARTÍNEZ, O. A.; MARILEO, L. G.; ACUÑA, J. J.; SAGGAR, S.; MORA, M. L. Effect of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two Chilean Andisol pastures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 99–107, jan. 2014. DOI 10.1007/s11274-013-1427-9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-013-1427-9>.

KONER, S.; CHEN, J.-S.; RATHOD, J.; HUSSAIN, B.; HSU, B.-M. Unravelling the ultramafic rock-driven serpentine soil formation leading to the geo-accumulation of heavy metals: An impact on the resident microbiome, biogeochemical cycling and acclimatized eco-physiological profiles. **Environmental Research**, v. 216, p. 114664, jan. 2023. DOI 10.1016/j.envres.2022.114664. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935122019910>. Acesso em: 25 abr. 2023.

KUMARI, P.; PRAKASH, P.; YADAV, S.; SARAN, V. Microbiome analysis: An emerging forensic investigative tool. **Forensic Science International**, v. 340, p. 111462, nov. 2022. DOI 10.1016/j.forsciint.2022.111462. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073822002924>. Acesso em: 22 jun. 2023.

LUO, J.; GU, S.; GUO, X.; LIU, Y.; TAO, Q.; ZHAO, H.-P.; LIANG, Y.; BANERJEE, S.; LI, T. Core Microbiota in the Rhizosphere of Heavy Metal Accumulators and Its Contribution to Plant Performance. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 18, p. 12975–12987, 20 set. 2022. DOI 10.1021/acs.est.1c08832. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.1c08832>. Acesso em: 23 jun. 2023.

MILLER, J. E. D.; COPELAND, S.; DAVIES, K.; ANACKER, B.; SAFFORD, H.; HARRISON, S. Plant community data from a statewide survey of paired serpentine and non-serpentine soils in CALIFORNIA, USA. **Ecology**, v. 103, n. 6, jun. 2022. DOI 10.1002/ecy.3644. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ecy.3644>. Acesso em: 11 maio 2023.

MITRA, D.; MONDAL, R.; KHOSHRU, B.; SENAPATI, A.; RADHA, T. K.; MAHAKUR, B.; UNIYAL, N.; MYO, E. M.; BOUTAJ, H.; SIERRA, B. E. G.; PANNEERSELVAM, P.; GANESHAMURTHY, A. N.; ELKOVIĆ, S. A.; VASIĆ, T.; RANI, A.; DUTTA, S.; MOHAPATRA, P. K. D. Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: Advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions. **Pedosphere**, v. 32, n. 1, p. 149–170, fev. 2022. DOI 10.1016/S1002-0160(21)60042-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002016021600425>. Acesso em: 12 jul. 2022.

NAGARAJAN, V.; TSAI, H.-C.; CHEN, J.-S.; HUSSAIN, B.; KONER, S.; HSEU, Z.-Y.; HSU, B.-M. Comparison of bacterial communities and their functional profiling using 16S rRNA gene sequencing between the inherent serpentine-associated sites, hyper-accumulator, downgradient agricultural farmlands, and distal non-serpentine soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 431, p. 128557, jun. 2022. DOI 10.1016/j.jhazmat.2022.128557. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389422003454>. Acesso em: 18 maio 2023.

NASCIMENTO, C. W. A. D.; LIMA, L. H. V.; SILVA, Y. J. A. B. D.; BIONDI, C. M. Ultramafic soils and nickel phytomining opportunities: A review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 46, p. e0210099, abr. 2022. DOI 10.36783/18069657rbcs20210099. Disponível em: <https://www.rbcjournal.org/article/ultramafic-soils-and-nickel-phytomining-opportunities-a-review/>. Acesso em: 12 maio 2023.

ORR, C. H.; STEWART, C. J.; LEIFERT, C.; COOPER, J. M.; CUMMINGS, S. P. Effect of crop management and sample year on abundance of soil bacterial communities in organic and conventional cropping systems. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 119, n. 1, p. 208–214, 2015. DOI 10.1111/jam.12822. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12822>.

PANTIGOSO, H. A.; NEWBERGER, D.; VIVANCO, J. M. The rhizosphere microbiome: Plant–microbial interactions for resource acquisition. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 5, p. 2864–2876, 1 nov. 2022. DOI 10.1111/jam.15686. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article/133/5/2864/6989002>. Acesso em: 22 maio 2023.

RABARI, A.; RUPARELIA, J.; JHA, C. K.; SAYYED, R. Z.; MITRA, D.; PRIYADARSHINI, A.; SENAPATI, A.; PANNEERSELVAM, P.; DAS MOHAPATRA, P. K. Articulating beneficial rhizobacteria mediated plant defenses through induced systemic resistance. **Pedosphere**, p. S1002016022000923, out. 2022. DOI 10.1016/j.pedsph.2022.10.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002016022000923>. Acesso em: 18 jun. 2023.

RAJ, Y.; KUMAR, A.; KUMARI, S.; KUMAR, R.; KUMAR, R. Comparative Genomics and Physiological Investigations Supported Multifaceted Plant Growth-Promoting Activities in Two *Hypericum perforatum* L.-Associated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Microbe-Assisted Cultivation. **Microbiology Spectrum**, p. e00607-23, 18 maio 2023. DOI 10.1128/spectrum.00607-23. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.00607-23>. Acesso em: 4 jun. 2023.

RAJAKARUNA, N.; BOYD, R. S. Edaphic Factor. **Encyclopedia of Ecology**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 361–367. DOI 10.1016/B978-0-12-409548-9.11159-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095489111595>. Acesso em: 25 abr. 2023.

RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 169–181, 2011. DOI 10.1016/j.plantsci.2010.08.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945210002402>. Acesso em: 16 abr. 2021.

RATTRAY, J. E.; ZETTERLIND, A.; SMITTENBERG, R. H.; POTISZIL, C.; NEUBECK, A. Complexity of the serpentinization lipidome. **Organic Geochemistry**, v. 174, p. 104514, dez. 2022. DOI 10.1016/j.orggeochem.2022.104514. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146638022001486>. Acesso em: 19 maio 2023.

SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 1, p. 25–41, 2018. DOI 10.1016/j.tplants.2017.09.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138517301991>. Acesso em: 18 abr. 2021.

SCHUMAN, M. C.; VAN DAM, N. M.; BERAN, F.; HARPOLE, W. S. How does plant chemical diversity contribute to biodiversity at higher trophic levels? **Current Opinion in Insect Science**, v. 14, p. 46–55, abr. 2016. DOI 10.1016/j.cois.2016.01.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214574516000043>. Acesso em: 12 maio 2023.

SENTHIL KUMAR, R.; KONER, S.; TSAI, H.-C.; CHEN, J.-S.; HUANG, S.-W.; HSU, B.-M. Deciphering endemic rhizosphere microbiome community's structure towards the host-derived heavy metals tolerance and plant growth promotion functions in serpentine geo-ecosystem. **Journal of Hazardous Materials**, v. 452, p. 131359, jun. 2023. DOI 10.1016/j.jhazmat.2023.131359. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389423006428>. Acesso em: 12 maio 2023.

SEUFERT, V. Comparing Yields: Organic Versus Conventional Agriculture. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, Netherlands, v. 3, p. 196–208, 2019. DOI 10.1016/b978-0-08-100596-5.22027-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22027-1>.

SHAH, A.; MATHUR, Y.; HAZRA, A. B. Double agent indole-3-acetic acid: mechanistic analysis of indole-3-acetaldehyde dehydrogenase AldA that synthesizes IAA, an auxin that aids bacterial virulence. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 8, p. BSR20210598, ago. 2021. DOI 10.1042/BSR20210598. Disponível em: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/41/8/BSR20210598/229488/Double-agent-indole-3-acetic-acid-mechanistic>. Acesso em: 18 maio 2023.

SIANTA, S. A.; KAY, K. M. Adaptation and divergence in edaphic specialists and generalists: serpentine soil endemics in the California flora occur in barer serpentine habitats with lower soil calcium levels than serpentine tolerators. **American Journal of Botany**, v. 106, n. 5, p. 690–703, maio 2019. DOI 10.1002/ajb2.1285. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajb2.1285>. Acesso em: 12 maio 2023.

SISTI, C. P. J.; DOS SANTOS, H. P.; KOHHANN, R.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 76, n. 1, p. 39–58, 2004. DOI <https://doi.org/10.1016/j.still.2003.08.007>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016719870300196X>.

TOUCEDA-GONZÁLEZ, M.; KIDD, P. S.; SMALLA, K.; PRIETO-FERNÁNDEZ, A. Bacterial communities in the rhizosphere of different populations of the Ni-hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* and the metal-excluder *Dactylis glomerata* growing in ultramafic soils. **Plant and Soil**, v. 431, n. 1–2, p. 317–332, out. 2018. DOI 10.1007/s11104-018-3767-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-018-3767-6>. Acesso em: 25 abr. 2022.

VISIOLI, G.; SANANGELANTONI, A. M.; CONTI, F. D.; BONATI, B.; GARDI, C.; MENTA, C. Above and belowground biodiversity in adjacent and distinct serpentine soils. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 98–103, 2019. DOI 10.1016/j.apsoil.2018.09.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139318307534>. Acesso em: 22 fev. 2021.

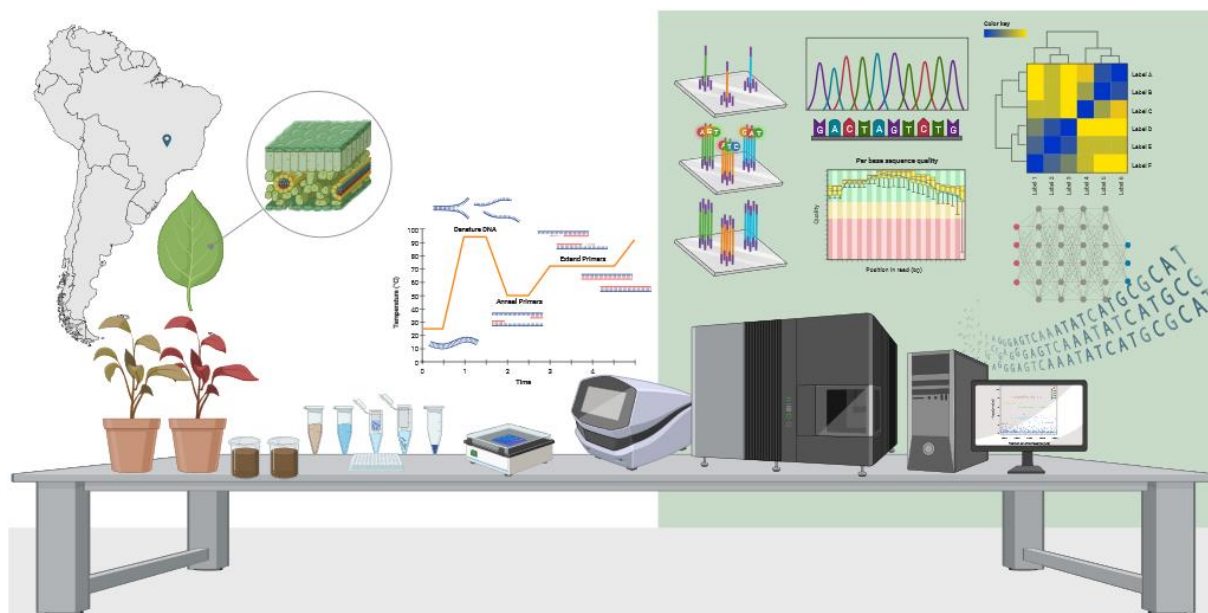
WHIPPS, J.; LEWIS, K.; COOKE, R. Mycoparasitism and plant disease control. **Fungi Biology Control**. Manchester University Press. Manchester: Burge M, 1988. p. 161–187. . Acesso em: 8 maio 2023.

WU, X. Z.; LIU, B. R.; YAN, X.; LIU, R. T.; AN, H. Response of soil microbial biomass and microbial entropy to desertification in desert grassland. **Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology**, v. 30, n. 8, p. 2691–2698, ago. 2019. DOI 10.13287/j.1001-9332.201908.009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31418194>.

XU, M.; XU, C.; CHEN, M.; XIAO, Z.; WANG, Y.; XU, Y.; XU, D. Comparative analysis of commonly used bioinformatics software based on omics. **Gene Reports**, v. 32, p. 101800, set. 2023. DOI 10.1016/j.genrep.2023.101800. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452014423000626>. Acesso em: 22 jun. 2023.

ZHANG, P.; LI, W.; QIU, H.; LIU, M.; LI, Y.; HE, E. Metal resistant gut microbiota facilitates snails feeding on metal hyperaccumulator plant *Sedum alfredii* in the phytoremediation field. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 236, p. 113514, maio 2022. DOI 10.1016/j.ecoenv.2022.113514. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651322003542>. Acesso em: 23 jun. 2023.

3. MICROBIOMA DA RIZOSFERA DE HIPERACUMULADORAS DE NÍQUEL ENDÊMICAS DE SOLOS ULTRAMÁFICOS



Resumo

Niquelândia é um município do estado de Goiás que detêm a maior reserva de solo ultramáfico do mundo. *Justicia lanstykii* e *Lippia lupulina* são duas espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel endêmicas encontradas em Niquelândia e que pertencem as famílias Acanthaceae e Verbenaceae, respectivamente. Hipotetiza-se que o microbioma da rizosfera das espécies vegetais *L. lupulina* e *J. lanstykii* endêmicas de sítios ultramáficos da Niquelândia possua baixa diversidade, bem como que as comunidades presentes na rizosfera das plantas hiperacumuladoras de níquel derivem do solo adjacente. Além disso, que existam grupos procarióticos que podem servir de biomarcadores para classificação do microbioma de ambas as espécies vegetais, bem como do solo adjacente. Este estudo visa caracterizar a estrutura e a diversidade das comunidades bacterianas na rizosfera das plantas hiperacumuladoras de níquel, bem como do solo adjacente sem vegetação. Utilizamos sequenciamento de alto rendimento para analisar as comunidades bacterianas no solo da rizosfera e adjacente das plantas. A composição do microbioma do solo adjacente sem vegetação foi comparada com o a composição do rizobioma das espécies vegetais hiperacumuladoras de níquel *Justicia lanstykii* e *Lippia lupulina*. Foi observada maior diversidade, riqueza e abundância do microbioma associado a rizosfera de ambas espécies

vegetais hiperacumuladoras de níquel estudadas, em comparação com o solo adjacente. O solo adjacente teve como principais filos representativos Acidobacteriota (23,5%), Spirochaetota (19%), Chloroflexota (15,93%). A rizosfera de *J. lanstykii* e *L. lupulina* possuem similaridade de composição de filos bacterianos, predominando Acidobacteriota, Spirochaetota, Chloroflexota com percentuais de abundância relativa próximos. As famílias Ketodonobacteraceae e Sphingomonadaceae foram identificadas como biomarcadores do solo adjacente. Gaiellaceae, Geodermatophilaceae e Chthoniobacteraceae como biomarcadores da rizosfera de *J. lanstykii*. Ketodonobacteraceae, SbA1 e Sphingomonadaceae podem ser usadas como biomarcadores da rizosfera de *L. lupulina*. Portanto, o solo adjacente à rizosfera de ambas as espécies vegetais hiperacumuladoras de níquel possuem diversidade, estrutura e composição distintas.

Palavras-chave: Solo ultramáfico. Diversidade microbiana. 16S rRNA. Sequenciamento Illumina. Diversidade Microbiana.

3. RHIZOSPHERE MICROBIOME OF NICKEL HYPERACUMULATORS ENDEMIC IN ULTRAMAPHIC SOILS

Abstract

Niquelândia is a municipality in the state of Goiás, home to the world's largest reserve of ultramafic soil. *Justicia lanstykii* and *Lippia lupulina* are two endemic nickel hyperaccumulator plant species found in Niquelândia, belonging to the families Acanthaceae and Verbenaceae, respectively. It is hypothesized that the rhizosphere microbiome of these species from ultramafic sites in Niquelândia exhibits low diversity and that the communities present in the hyperaccumulator plant rhizospheres derive from the adjacent soil. Additionally, it is suggested that certain prokaryotic groups may serve as biomarkers for classifying the microbiome of both plant species and the adjacent soil. This study aims to characterize the structure and diversity of bacterial communities in the rhizosphere of nickel hyperaccumulator plants, as well as in adjacent vegetation-free soil. We employed high-throughput sequencing to analyze bacterial communities in the rhizosphere and adjacent soil of these plants. The composition of the microbiome in the vegetation-free adjacent soil was compared with that of the rhizobiome of *Justicia lanstykii* and *Lippia lupulina*. We observed greater diversity, richness, and abundance of the microbiome associated with the rhizosphere of both studied nickel hyperaccumulator plant species compared to the adjacent soil. The main representative phyla in the adjacent soil were Acidobacteriota (23.5%), Spirochaetota (19%), and Chloroflexota (15.93%). The rhizospheres of *J. lanstykii* and *L. lupulina* exhibited similar compositions of bacterial phyla, predominantly Acidobacteriota, Spirochaetota, and Chloroflexota with similar relative abundance percentages. The families Ketodonobacteraceae and Sphingomonadaceae were identified as biomarkers of the adjacent soil. Gaiellaceae, Geodermatophilaceae, and Chthoniobacteraceae were identified as biomarkers of the *J. lanstykii* rhizosphere. Ketodonobacteraceae, SbA1, and Sphingomonadaceae can serve as biomarkers of the *L. lupulina* rhizosphere. Therefore, the soil adjacent to the rhizosphere of both nickel hyperaccumulator plant species exhibits distinct diversity, structure, and composition.

Keywords: Ultramafic soil, microbial diversity, 16S rRNA, Illumina sequencing, Microbial Diversity

3.1 Introdução

A caracterização de espécies de plantas que acumulam níquel em seus tecidos é um resultado de um esforço de anos de pesquisa, tendo como primeiro registro Baker & Brooks (1989). Os autores relataram que aproximadamente 2000 espécies de plantas possuíam a capacidade de hiperacumular níquel em seus tecidos superiores. Tais autores consideravam plantas hiperacumuladoras de níquel aquelas que possuíam acima de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ de níquel por matéria seca (0,1% ou mais), conceito que permanece vigente.

Plantas hiperacumuladoras de níquel são seres vivos dotados de uma extraordinária habilidade de resistir e sequestrar esse metal em seus tecidos, desempenhando assim papéis ecológicos relevantes. Em primeiro lugar, elas podem ser utilizadas para restaurar áreas degradadas pela contaminação metálica, seja pela extração do excesso de níquel do solo, seja pela exploração econômica desse recurso através da agromineração. Em segundo lugar, elas podem favorecer a manutenção da biodiversidade, pois ao reduzirem a disponibilidade de metais pesados no solo, permitem a coexistência de outras espécies vegetais, animais e microbianas que dependem delas como hospedeiras. Em terceiro lugar, elas podem servir como indicadores biológicos, pois revelam a presença de níquel em níveis considerados como anormais. Além disso, elas oferecem a oportunidade de estudos que envolvam os mecanismos fisiológicos e moleculares de tolerância e acumulação de metais. Portanto, plantas hiperacumuladoras de níquel possuem não apenas importância ecológica, mas também potencial biotecnológico, como na produção de plantas transgênicas e de compostos bioativos (NASCIMENTO et al., 2022).

O crescimento de plantas em solos derivados de rochas ultramáficas é comumente restringido pelas condições edáficas naturais, exigindo das plantas o desenvolvimento de mecanismos adaptativos para tolerar a toxicidade de elementos metálicos presentes em grande concentração (DEMENOIS et al., 2020; REEVES et al., 2007). Este é o caso das espécies *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas de sítios ultramáficos na região de Niquelândia.

L. lupulina é uma espécie de planta que ocorre no Cerrado brasileiro e que pertence à família Verbenaceae. Trata-se de uma planta com 0,3 a 0,8m de altura e com conformação subarbustiva. Suas flores do tipo inflorescências cimosas axiliares ou terminais que podem variar de tons entre o rosa e o lilás. *L. lupulina* apresenta propriedades medicinais devido sua atividade antimicrobiana (FUNARI et al., 2016). Também é apreciada ornamentalmente devido seu porte. Entretanto, é uma espécie com altos índices de endemismo, dificultando a sua

capacidade em ser propagada (CARDOSO et al., 2020). Além disso, não existem estudos que envolvam a relação entre solos derivados de rochas ultramáficas e a ocorrência de *L. lupulina*. De forma geral, estudos envolvendo esta espécie vegetal são escassos.

J. lanstyakii, espécie vegetal nativa do bioma Cerrado brasileiro, é um membro da família Acanthaceae. Esta espécie se caracteriza por ter um porte subarbustivo, geralmente não ultrapassando 1 metro de altura. Uma das características mais notáveis desta planta é a presença de inflorescências de cor vermelha vívida, que são circundadas por estruturas foliáceas diminutas. Além de sua aparência distinta, a *J. lanstyakii* possui a propriedade bioquímica de hiperacumulação de níquel. Esta característica torna *J. lanstyakii* uma candidata promissora para aplicações em fitorremediação e agromineração, processos que utilizam plantas para remover ou extrair metais do solo. A existência de um protocolo de propagação definido para a *J. lanstyakii* facilita sua manipulação e uso, tornando-a ainda mais atraente para tais aplicações (DE ANDRADE; DE GÓIS AQUINO; REIS, 2015; LIMA et al., 2022) Portanto, essa espécie representa não apenas uma parte importante da biodiversidade do Cerrado, mas também um recurso potencial para a gestão sustentável dos solos derivados de rochas ultramáficas.

O Cerrado brasileiro é um bioma que abriga mais de 12000 espécies vegetais, sendo 40% delas endêmicas. O alto grau de endemismo confere heterogeneidade de habitat que está intimamente relacionado com as concentrações de elementos metálicos como o Ni em solos derivados de rochas ultramáficas. As formações ultramáficas, que constituem uma ínfima porção de 0,2% do bioma do Cerrado, são encontradas em fragmentos diminutos e ilhas geoquímicas. Estas ilhas apresentam uma diversidade de tamanhos e distâncias entre si. O complexo ultramáfico de Canabrava, Niquelândia e Barro Alto, situado na região central do Estado de Goiás, representa cerca de 70% dos solos ultramáficos do Cerrado. Esta distribuição geográfica sugere uma intrincada interação entre processos geológicos e biológicos ao longo do tempo (MENDONÇA et al., 2008).

Conceitualmente, compreende-se como microbioma todos os micro-organismos de uma comunidade que ocupam um habitat razoavelmente bem definido, abrangendo seu “teatro de atividade” (BERG et al., 2020; WHIPPS; LEWIS; COOKE, 1988). Os elementos constituintes do microbioma desempenham um papel crucial como catalisadores da adaptabilidade das plantas ao ambiente (BULGARELLI et al., 2013). A presença e a sobrevivência de espécies vegetais estão intrinsecamente ligadas à composição do seu microbioma, uma vez que a interação simbiótica entre os organismos contribui para a adaptabilidade ao ambiente, a aptidão biológica e o estado nutricional otimizado (RIBEIRO et al., 2020).

As ilhas geoquímicas ultramáficas que ocorrem no Cerrado brasileiro selecionam naturalmente espécies vegetais que sejam adaptadas, como é o caso de *L. lupulina* e *J. lanstykii* as quais desenvolveram a capacidade de hiperacumular níquel em seus tecidos superiores (MENDONÇA et al., 2008). A compreensão do microbioma associado a essas plantas é de suma importância, visto que desempenha um papel determinante na adaptação das plantas às condições edáficas extremas, auxiliando na absorção, tolerância e possível detoxificação do níquel (WU et al., 2022). Acessar o microbioma dessas espécies é crucial para revelar não apenas suas estratégias adaptativas, mas também para identificar possíveis aplicações na biotecnologia, como fitorremediação e agromineração.

Estudos acerca do microbioma associado as espécies de plantas endêmicas de sítios ultramáficos na Niquelândia são inexistentes. A análise exploratória pelas bases de busca não retornou nenhum resultado acerca da composição do microbioma, seus mecanismos de interação com as plantas, bem como acerca da predição ou potencial de funções associadas aos micro-organismos.

Compreender a composição, estrutura e funcionamento do microbioma de espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel endêmicas de solos ultramáficos é a base para o desenvolvimento de técnicas e biotecnologias voltadas para a remediação de áreas contaminadas, para a agromineração/fitomineração de metais de forma sustentável, para o desenvolvimento de bioprodutos e para adoção de um manejo adequado para conservação dessas ilhas geoquímicas.

3.1 Hipóteses

O microbioma da rizosfera das espécies vegetais *L. lupulina* e *J. lanstykii* endêmicas de sítios ultramáficos da Niquelândia possui baixa diversidade e é estritamente relacionados as espécies vegetais as quais se associaram. Entretanto, as comunidades presentes na rizosfera das plantas hiperacumuladoras de níquel derivam do solo adjacente não rizosférico. Existem grupos procarióticos que podem servir de biomarcadores para classificação do microbioma de ambas as espécies vegetais, bem como do solo adjacente.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Avaliar o microbioma associado às espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a estrutura do microbioma associado às espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.
2. Analisar a diversidade do microbioma associado às espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.
3. Identificar a composição do microbioma associado às espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.
4. Verificar as interações que moldam as comunidades microbianas do microbioma associado às espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.
5. Identificar micro-organismos biomarcadores do microbioma associado às espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia utilizando algoritmo de *machine learning*.
6. Predizer o metagenoma funcional dos micro-organismos identificados associado às espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Seleção das espécies de plantas

A partir de estudos previamente conduzidos com 14 espécies vegetais quanto a tolerância, exclusão e acúmulo de níquel, foi verificado por Fluorescência de Raios X Portátil (FRXp) e confirmado por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP – OES Perking Elmer 7000 DV) que *L.lupulina* e *J. lanstykii* eram capazes de acumular 3042,5 e 3863 mg kg⁻¹ de Ni, respectivamente (VIEIRA LIMA, 2023).

Além de serem espécies endêmicas de Niquelândia, tais resultados apontaram *L.lupulina* e *J. lanstykii* como espécies destaque quanto a capacidade de hiperacumulação de níquel em comparação com outras plantas avaliadas. Justificando, portanto, a seleção de tais espécies como objetos de estudo para as análises de microbioma do presente trabalho.

3.3.2 Descrição do local de coleta das amostras de solo

Para a realização do presente estudo, foram coletadas amostras de solos da rizosfera de *L.lupulina* e *J. lanstykii* e do solo adjacente à rizosfera no município de Niquelândia – GO (14° 27'28"S e 48° 27' 59"O). A região é caracterizada por um clima tropical com invernos secos, encaixando-se na descrição *Aw* de Köppen (ROLIM et al., 2007). O ambiente de estudo é conhecido por sua riqueza natural em elementos como níquel, cromo e cobalto derivados das rochas ultramáficas que deram origem ao solo desse sítio e que conferem características singulares à vegetação endêmica (Tabela 1). A precipitação e temperatura média anual são de 1500 mm e 22° C (INMET, 2023).

Tabela 1. Atributos químicos e físicos dos solos ultramáficos da Niquelândia (Cambissolo) (VIEIRA LIMA, 2023).

Atributos	Solo (Cambissolo)	Unidade
pH (H ₂ O) (1:2,5)	6,500	-
H + Al	2,300	cmolc dm ⁻³
Ca	0,600	
Mg	3,000	
Al	0,000	
Na	0,400	
K	0,100	
P	0,000	mg dm ⁻³
SM ^a	6,30E-02	10 ⁻⁸ xSI
COS ^b	12,000	g kg ⁻¹
Areia	298,000	
Silte	487,000	
Argila	215,000	

^a Susceptibilidade magnética; ^b Carbono Orgânico do Solo

3.3.3 Coleta e extração do DNA das amostras de solo

A critério de identificação, para amostras de solo rizosférico foram considerados como tal o solo aderido às raízes das espécies de plantas *L. lupulina* e *J. lanstykii*. A coleta foi realizada em triplicata composta por uma homogeneização de três amostras simples por espécie, com auxílio de espátula previamente esterilizada com álcool 70%, sendo posteriormente identificadas e acondicionadas em recipiente contendo gelo para preservação do material. Bem como, também foram coletadas amostras de solo adjacente à rizosfera em triplicata composta por uma homogeneização de três amostras simples. As amostras foram armazenadas em freezer a -20° C até a realização do procedimento de extração do DNA.

A extração do DNA das amostras de solo foi realizada com o kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN Laboratories, Carlsbad, CA, USA) conforme as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (100V por 30 minutos) acrescido de SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, o DNA extraído foi quantificado com Qubit XX Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) e padronizado o volume de DNA de cada amostra para 50 ng.

3.3.4 Amplificação e sequenciamento das amostras de solo

As inter-regiões V3 a V4 do gene 16S rRNA presente em organismos procarióticos foram amplificadas utilizando o conjunto de primers 515f (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806r (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) seguindo o protocolo Illumina. As condições de ciclagem foram as descritas a seguir: 95° C por 3 minutos, seguidos por 25 ciclos de 95° C por 20 segundos, 55° C por 10 segundos e 72° C por 20 segundos, com uma extensão final de 72° C por 5 minutos. As reações foram realizadas com KAPA High-Fidelity DNA Polymerase, a partir de 1µL do DNA molde. A quantificação das amostras foi realizada com Qubit XX Fluorometer e corridas em condições de equimolaridade na plataforma Illumina Miseq para o comprimento de 150 pb paired-end (CAPORASO et al., 2012).

3.3.4 Análise de bioinformática com os dados de sequenciamento das amostras de solo

Os resultados do sequenciamento de amplicons de alta qualidade foram analisados utilizando o pacote DADA2 no ambiente R a partir da inferência de Variantes de Sequências de Amplicons (ASVs) (CALLAHAN et al., 2016). Além disso, as *reads* resultados do sequenciamento também foram analisadas por Unidade Operacional Taxonômica (OTUs) usando a plataforma SHAMAN (VOLANT et al., 2020). O banco de dados utilizado para anotação taxonômica foi o GreenGenes (MCDONALD et al., 2012; QUAST et al., 2012).

4.3.5 Análises estatísticas dos resultados de sequenciamento das amostras de solo

Para elaboração dos gráficos de abundância relativa de acordo com os níveis taxonômicos de filo, classe, ordem e família foi utilizado o pacote MicrobiotaProcess no ambiente R a partir dos dados previamente anotados. A fim de comparar a composição microbiana entre as diferentes amostras foi realizada a análise de heatmap a níveis de filo e classe (XU et al., 2023).

A α -diversidade foi estimada utilizando a matriz de abundância de OTUs uniformemente rarefeita com riqueza observada para espécies observadas, índices de Shannon (H'), Simpson (D), ACE, Chao1 e equitabilidade de Pielou (J'). A significância do grupo de diversidade alfa foi avaliada com um teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar os tratamentos. Para explorar as relações entre os nichos edáficos e as estruturas das comunidades bacterianas, foram conduzidas as análises Multidimensional Não Métrica (NMDS) e de Coordenadas Principais (PCoA). As distâncias entre as amostras foram calculadas utilizando o método de Bray-Curtis após a transformação e distribuição de Hellinger. Todas essas análises foram executadas com o pacote MicrobiotaProcess, proporcionando uma abordagem abrangente para avaliação da diversidade bacteriana nos dados analisados (MCMURDIE; HOLMES, 2013; XU et al., 2023).

3.3.6 Análise de Random Forest

Os dados previamente tratados e analisados foram submetidos a análise de Random forest para identificação de grupos procarióticos específicos de cada nicho edáfico que sirvam de biomarcadores. Para tanto, os dados foram importados para o Microbiome Analyst no qual foi calculada a partir de 20 preditores e 500 ramificações a partir de um efeito fixo os potenciais filios biomarcadores a partir de algoritmos de machine learning supervised (LU et al., 2023).

3.3.7 Análise de network

Para investigar a relação entre as OTUs, foram construídas redes de associação microbiana com base no coeficiente de correlação de Spearman (ρ), que foi calculado usando o software R (pacote: multtest) (POLLARD; DUDOIT; VAN DER LAAN, 2005). Apenas correlações com $p < 0,05$ foram selecionadas para análises posteriores. A análise de correlação gerada foi importada para o software Gephi, no qual as redes foram visualizadas e calculadas as propriedades topológicas (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009). As dimensões dos nós foram ajustadas conforme o grau calculado de cada nó e suas cores mediante a centralidade de intermediação. As arestas foram representadas pelas cores vermelho e azul correspondente as correlações negativas ou positivas, respectivamente. A distribuição adotada para visualização gráfica foi a de Fruchterman Reingold. A partir mesmo conjunto de dados

analisado, a correlação de network também foi verificada em termos de abundância relativa dos filós de acordo com o grupo de amostras usando o Microbiome Analyst (LU et al., 2023).

3.3.8 Análise de predição funcional do metagenoma

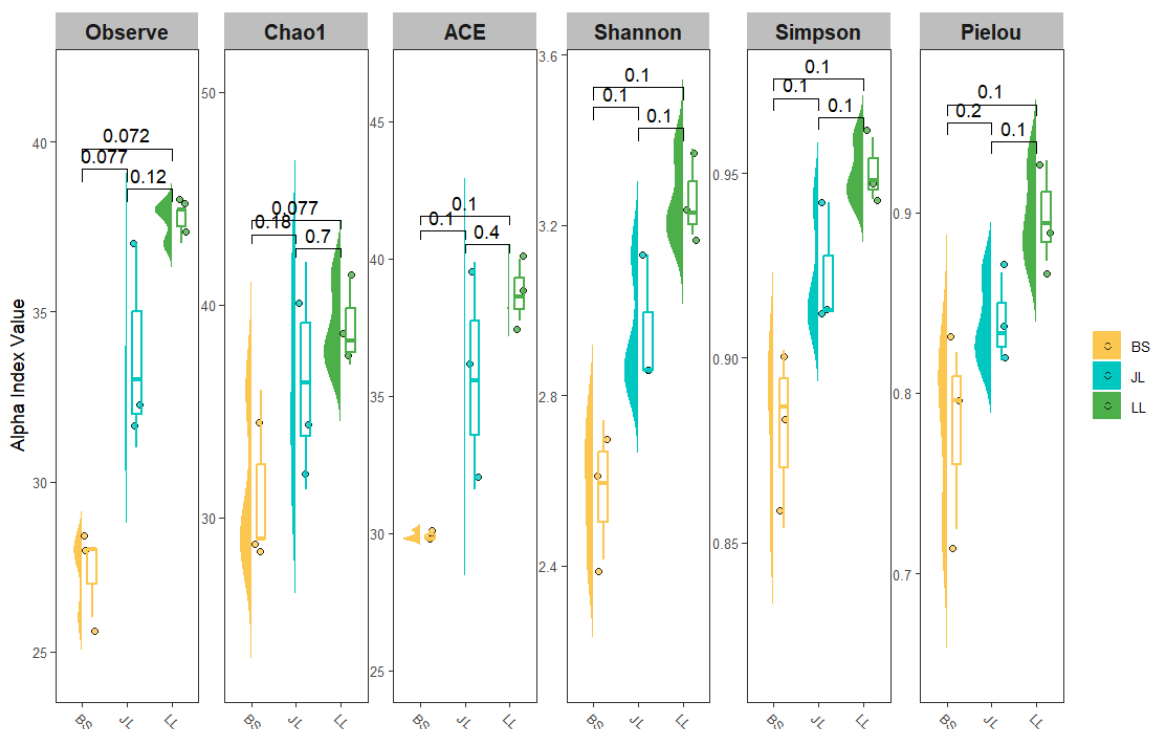
A partir do conjunto de sequências únicas e da tabela de OTUs com perfil de similaridade de identidade igual ou superior a 97%, foi realizada a análise de predição funcional do metagenoma. Utilizou-se o PICRUSt para inferir a potencial capacidade genética das comunidades bacterianas (DOUGLAS et al., 2020; LANGILLE et al., 2013). A análise da abundância relativa foi realizada para investigar as 30 funções recorrentemente identificadas para todas as amostras. Para isso, foram utilizados os pacotes dplyr, ggplot2 e reshape2 no ambiente R (WICKHAM, 2016, 2007; WICKHAM; FRANCOIS, 2015). Para visualização e análise de vias celulares, os *EC numbers* (*Enzyme Commission numbers*) identificados no PICRUSt foram analisados com iPath3 (DARZI et al., 2018). Também foram calculadas as abundâncias relativas percentuais por amostra para os ciclos biogeoquímicos do carbono, metano, nitrogênio, fósforo e enxofre correspondentes a anotação disposta no KEGG Pathway Database para cada ciclo e plotado um heatmap com base nos *counts*.

3.4 Resultados

3.4.1 Análise de alpha diversidade do microbioma

Os resultados da análise de alpha diversidade mostram uma menor diversidade associada ao conjunto de dados do solo geral (conjunto com prefixo BS – Bulk Soil) em comparação com as amostras rizosféricas de ambas espécies (conjunto com o prefixo RS – Rhizosphere Soil) (Figura 1).

Figura 1. Índices de diversidade alpha para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e do solo adjacente.



O índice de riqueza observada verifica a diversidade de espécies observadas e a abundância relativa dessas espécies, desconsiderando outros aspectos da diversidade biológica. Analisando o índice de diversidade Chao1, percebe-se que o número de espécies observadas e o número de espécies não observadas (espécies únicas) praticamente indifere. A estimativa de riqueza de espécies de abundância rara verificada pelo índice ACE (Abundance-based Coverage Estimator) revelou valores próximos ao número observado de espécies na amostra, sugerindo que o sequenciamento alcançou a maioria das espécies presentes.

A análise estatística revelou significativa diferença entre diversidade presente na rizosfera e no solo adjacente mediante todos os índices de diversidade calculados. Entretanto, os resultados dos índices de diversidade Chao1, ACE e Simpson apontam uma maior

diversidade presente na rizosfera de *L. lupulina* em relação a *J. lanstykii*, sendo ainda menor no solo adjacente (Tabela 2).

Tabela 2. Valores dos índices de diversidade alfa para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e do solo adjacente.

ID Seq	ID Amostras	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	Fisher
P1B	BS_NIQ1	29,000 B	31,000 ± 2,581 B	32,116 ± 2,697 B	2,355 B	0,842 B	6,522 B
P2B	BS_NIQ2	26,000 B	29,000 ± 4,157 B	28,555 ± 2,652 B	2,584 B	0,885 B	5,827 B
P3B	BS_NIQ3	28,000 B	29,000 ± 1,812 B	29,598 ± 2,457 B	2,705 B	0,896 B	6,212 B
P4B	RS_JL1	33,000 A	36,333 ± 4,117 AB	35,574 ± 2,860 AB	2,862 A	0,914 AB	8,123 A
P5B	RS_JL2	31,000 A	31,333 ± 0,923 AB	31,601 ± 2,733 AB	2,860 A	0,912 AB	7,497 A
P6B	RS_JL3	37,000 A	40,333 ± 4,118 AB	39,282 ± 3,032 AB	3,126 A	0,941 AB	9,249 A
P7B	RS_LL1	38,000 A	38,500 ± 1,293 A	38,744 ± 3,012 A	3,386 A	0,960 A	9,101 A
P8B	RS_LL2	37,000 A	37,000 ± 0,123 A	37,357 ± 3,027 A	3,227 A	0,949 A	8,744 A
P9B	RS_LL3	38,000 A	39,500 ± 2,228 A	40,025 ± 3,177 A	3,188 A	0,944 A	8,994 A

Letras maiúsculas representam diferenças significativas por amostra pelo teste de Tukey (0,05).

3.4.3 Análise da composição do microbioma

A análise do sequenciamento do amplicons revelou que a comunidade procariótica do solo era composta por 14 filos, 20 classes, 21 ordens e 21 famílias baseado no banco de dados Greengenes. As anotações em níveis de gênero e espécie não demonstraram boa cobertura devido às limitações inerentes à tecnologia de sequenciamento utilizada.

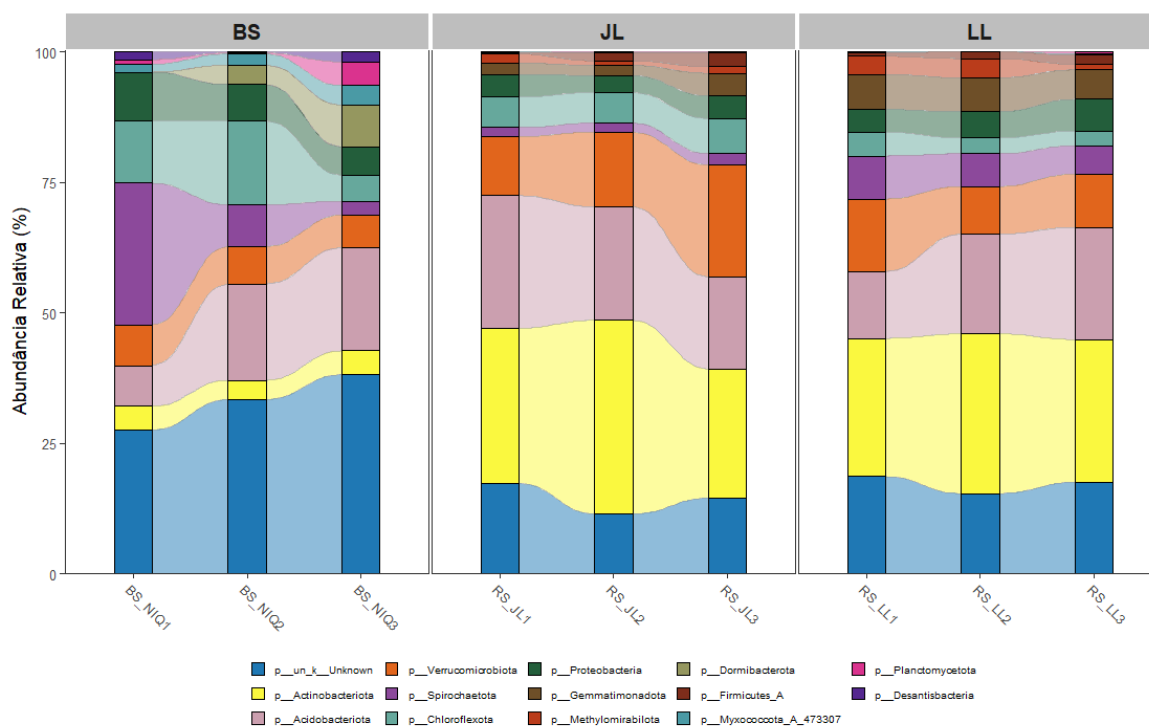
A nível de filo, as amostras de solo adjacente tiveram como principais filos representativos Acidobacteriota (23,5%), Spirochaetota (19%) e Chloroflexota (15,93%). A rizosfera de *J. lanstykii* demonstrou ter como principais filos associados Actinobacteriota (35,57%), Acidobacteriota (25,5%) e Verrucomicrobiota (17,97%). Já para *L. lupulina* os principais representantes foram Actinobacteriota (34,73%), Acidobacteriota (21,07%) e Verrucomicrobiota (13,17%).

Os grupos procarióticos que foram diferencialmente abundantes entre as amostras de solo adjacente (BS) e as rizosferas de *J. lanstykii* e *L. lupulina* (RS_JL e RS_LL, respectivamente) foram Actinobacteriota, Proteobacteria, Myxococcota, Gemmatimonadota e Methylospirillum (p < 0,05).

O filo Actinobacteriota foi significativamente mais abundante nas amostras rizosféricas de ambas as espécies em estudo quando comparadas com o solo adjacente (p < 0,05). O oposto foi verificado em relação ao filo Proteobacteria que mostrou maior abundância no solo adjacente que em amostras rizosféricas de ambas as espécies (p < 0,05). O mesmo comportamento foi observado em relação ao filo Myxococcota e Gemmatimonadota que teve

maior abundância no solo adjacente ($p > 0,05$). *Methylomirabilota* demonstrou maior abundância na rizosfera de *L. lupulina* e menor abundância no solo adjacente, as amostras da rizosfera de *J. lanstykii* demonstraram abundância intermediária ($p < 0,05$) (Figura 2).

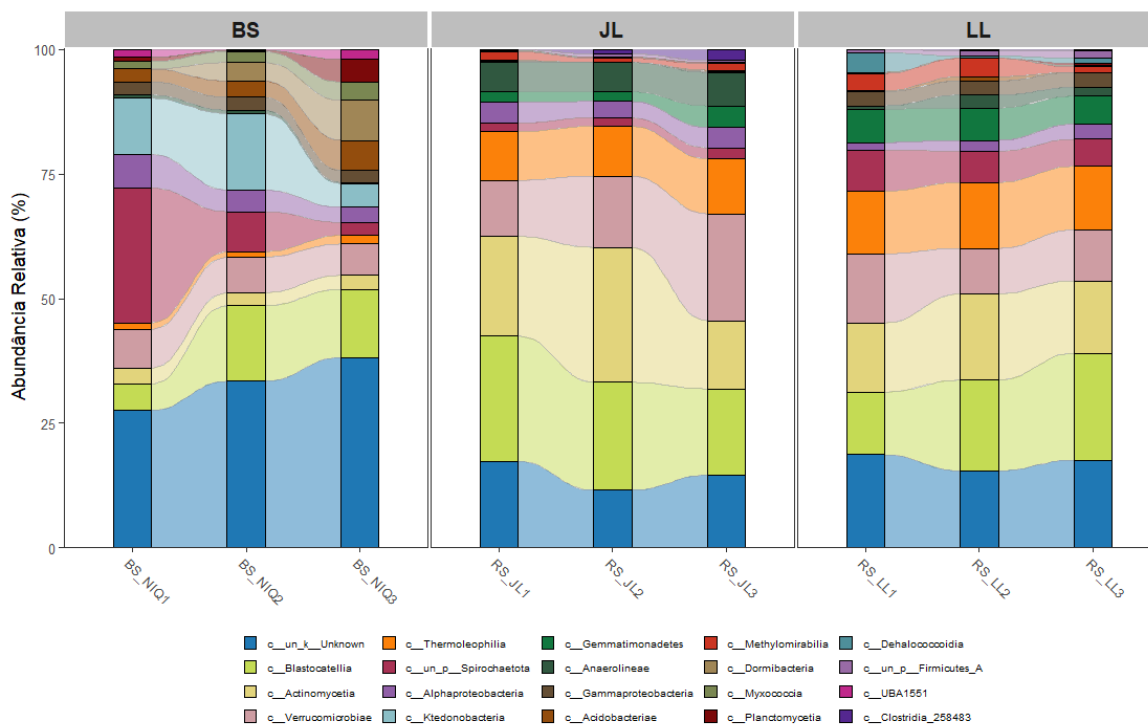
Figura 2. Abundância relativa percentual a nível de filo para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.



A nível de classe os grupos procarióticos com abundância diferencialmente significativa entre as amostras de solo adjacente (BS) e as rizosferas de *J. lanstykii* e *L. lupulina* (RS_JL e RS_LL, respectivamente) foram Actinomycetia, Thermoleophilia, Alphaproteobacteria, Anaerolineae, Gammaproteobacteria, Acidobacteriae e Dormibacteria ($p < 0,05$).

Foi observado que a abundância de Acidobacteriae e Actinomycetia foi significativamente maior nas amostras rizosféricas quando comparadas com o solo adjacente ($p < 0,05$). As classes Anaerolineae e Thermoleophilia foram mais abundantes na rizosfera de *L. lupulina* do que na rizosfera de *J. lanstykii* e teve menor abundância no solo adjacente ($p < 0,05$). As classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram significativamente mais abundantes no solo adjacente em comparação com as amostras rizosféricas ($p < 0,05$). Foi observado que a classe Dormibacteria foi mais abundante no solo adjacente ($p < 0,05$) (Figura 3).

Figura 3. Abundância relativa percentual a nível de classe para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.



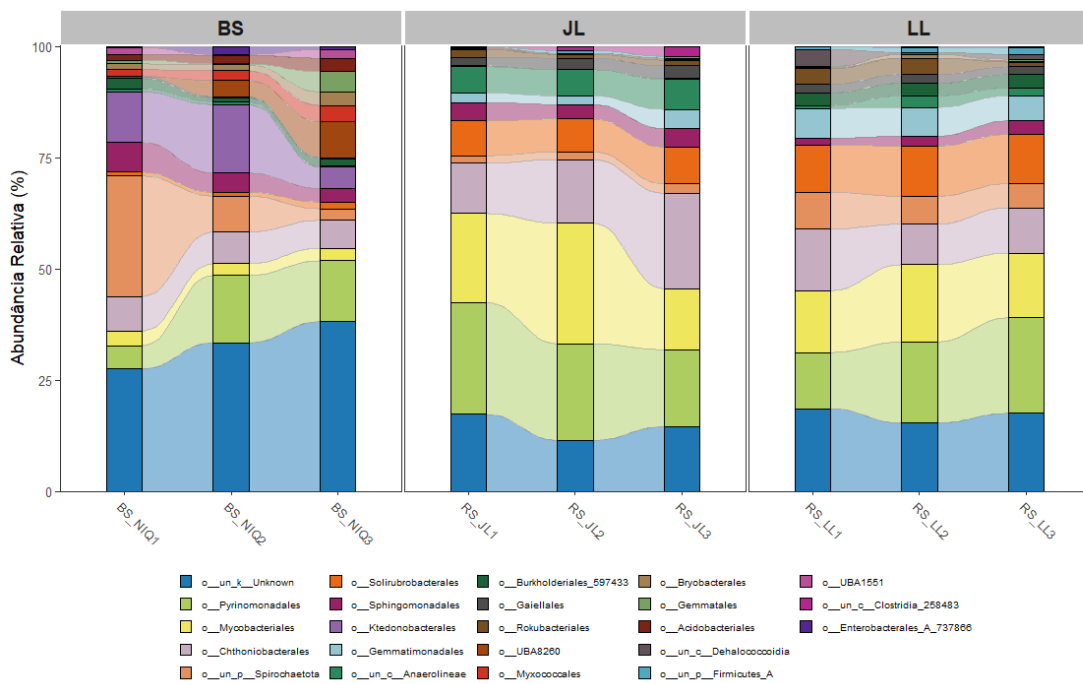
A nível de ordem, a anotação taxonômica resultou em 21 ordens procarióticas caracterizadas associadas aos sítios contendo solos derivados de rochas ultramáficas na Niquelândia. As amostras de tiveram como representantes significativamente distintos Acidobacteriales, Bryobacterales, Burkholderiales, Gaiellales, Gemmatimonadales, Ktedonobacterales, Mycobacteriales, Myxococcales, Rokubacteriales, Solirubrobacterales e grupos sem classificação (NA).

O solo adjacente (BS) mostrou uma composição principal sem assinatura taxonômica identificada (NA) média de 47,66%. Considerando as ordens predominantes, Pyrinomonadales apresentou média de 11,32%, seguido por Ktedonobacterales 10,36% e Chthoniobacterales 6,91%. As amostras rizosféricas de *J. lanstyakii* e *L.lupulina* demonstraram anotação taxonômica ao nível de ordem predominantemente composta por membros sem assinatura taxonômica identificada (NA), 23,95% e 28,19% respectivamente. Para *J. lanstyakii* as ordens mais abundantes foram Pyrinomonadales (21,68%), Mycobacteriales (20,15%) e Chthoniobacterales (15,43%). Para *L.lupulina* as ordens mais abundantes foram Pyrinomonadales (17,22%), Mycobacteriales (15,87%) e Chthoniobacterales (10,91%).

A análise estatística revelou 10 ordens com diferenças significativas entre as amostras de solo em estudo, a saber: Acidobacteriales, Bryobacterales, Burkholderiales, Gaiellales,

Gemmatimonadales, Ktedonobacterales, Mycobacterales, NA, Rokubacterales e Solirubrobacterales. Grupos procarióticos pertencentes as ordens Acidobacterales, Bryobacterales, Ktedonobacterales e NA foram significativamente mais abundantes nas amostras de solo adjacente (BS) em comparação com as amostras rizosféricas ($p < 0,05$). Burkholderiales demonstrou ser significativamente mais abundante na rizosfera de *L. lupulina*, sendo menor nas amostras de BS e *J. lanstykii*, respectivamente ($p < 0,05$). A ordem Gaiellales foi significativamente mais abundante nas amostras rizosféricas de ambas as espécies, sendo menor no solo adjacente ($p < 0,05$). Gemmatimonadales foi significativamente maior na rizosfera de *L. lupulina*, menos abundante na rizosfera de *J. lanstykii* e não verificada no solo adjacente ($p < 0,05$). Mycobacterales foi significativamente mais abundante para a rizosfera de ambas as espécies e menos abundante no solo adjacente ($p < 0,05$). Rokubacterales foi significativamente maior na rizosfera de *L. lupulina*, menos abundante na rizosfera de *J. lanstykii* e não verificada no solo adjacente ($p < 0,05$). Solirubrobacterales demonstrou abundância significativamente maior na rizosfera de *L. lupulina*, menor para *J. lanstykii* e inferior para BS ($p < 0,05$). Grupos procarióticos sem assinatura taxonômica foram mais significativos em BS, menor para rizosfera de *L. lupulina* e inferior para *J. lanstykii* ($p < 0,05$). A composição do microbioma a nível de ordem pode ser verificada na Figura 4.

Figura 4. Abundância relativa percentual a nível de ordem para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia no solo adjacente.



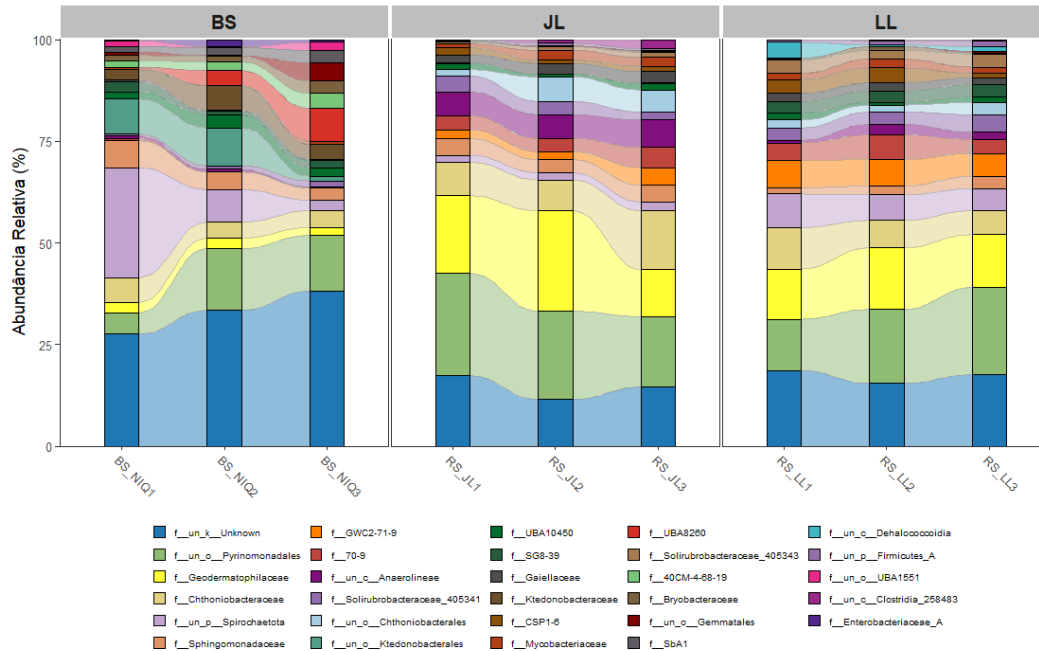
A nível de família, a anotação taxonômica resultou em 21 famílias procarióticas caracterizadas associadas aos sítios contendo solos derivados de rochas ultramáficas na Niquelândia. As amostras de tiveram como representantes significativamente distintos: 40CM-4-68-19, 70-9, Bryobacteraceae, CSP1-6, Gaiellaceae, Geodermatophilaceae, GWC2-71-9, Ktedonobacteraceae, SbA1, SG8-39, Solirubrobacteraceae e grupos sem assinatura taxonômica identificada (NA).

O solo adjacente (BS) mostrou ser predominantemente composto pelas famílias: Chthoniobacteraceae (22,4%), Sphingomonadaceae (21,2%), Geodermatophiliaceae (12,1%) e SG8-39 (10,9%). A rizosfera de *J. lanstykii* mostrou ser predominantemente composta pelas famílias: Geodermatophilaceae (36,3%), Chthoniobacteraceae (20,0%), 70-9 (8,0%), Sphingomonadaceae (7,8%). A rizosfera de *L. lupulina*, por sua vez, teve como principais membros familiares os seguintes grupos: Geodermatophilaceae (27,7%), Chthoniobacteraceae (14,3%), sem assinatura taxonômica identificada (NA) (13,8%) e GWC2-71-9 (11,9 %).

A análise estatística a revelou 13 famílias com diferenças significativas entre as amostras de solo em estudo, a saber: 40CM-4-68-19, 70-9, Bryobacteraceae, CSP1-6, Gaiellaceae, Geodermatophilaceae, GWC2-71-9, Ktedonobacteraceae, SbA1, SG8-39, Solirubrobacteraceae 405341, Solirubrobacteraceae 405343 e sem assinatura taxonômica identificada (NA) ($p < 0,05$).

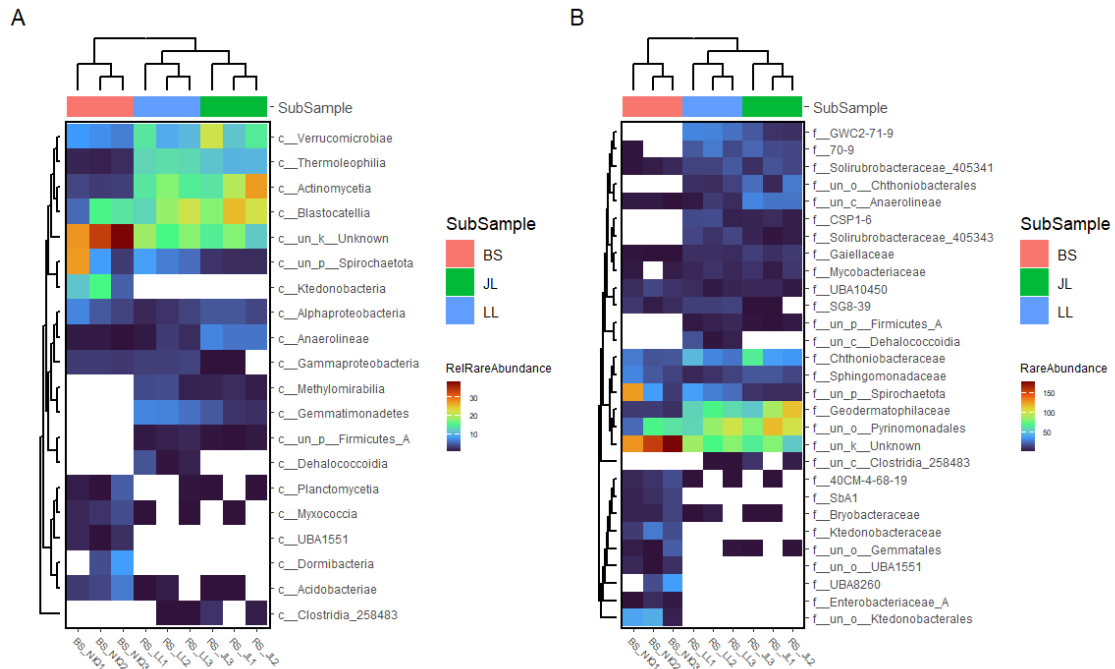
Foi observado que famílias com abundâncias significativamente distintas para o grupo de amostras BS foram: 40CM-4-68-19, Bryobacteraceae, Ktedonobacteraceae, SbA1 e NA ($p < 0,05$). Foi observado que os grupos familiares com abundâncias significativamente distintas para a rizosfera de *J. lanstykii* foram: 70-9, Gaiellaceae, Geodermatophilaceae, Solirubrobacteraceae 405341 ($p < 0,05$). Foi observado que os grupos familiares com abundâncias significativamente distintas para a rizosfera de *L. lupulina* foram: 70-9, CSP1-6, Gaiellaceae, Geodermatophilaceae, GWC2-71-9, SG8-39, Solirubrobacteraceae 405341 e Solirubrobacteraceae 405343 ($p < 0,05$). Para alguns grupos familiares as amostras rizosféricas não apresentaram diferenças significativas entre si em termos de abundância e por isso estão representados nas descrições de ambos, a saber: 70-9, Gaiellaceae, Geodermatophilaceae e Solirubrobacteraceae 405341 ($p < 0,05$). Alguns grupos familiares apresentaram contagem zero, como verificado em: CSP1-6 para o grupo BS, GWC2-71-9 no solo adjacente, Ktedonobacteraceae para a rizosfera de *J. lanstykii* e para a rizosfera de *L. lupulina*, SbA1 para a rizosfera de *J. lanstykii* e para a rizosfera de *L. lupulina* e Solirubrobacteraceae 405343 para o solo adjacente. A composição do microbioma a nível de ordem pode ser verificada na Figura 5.

Figura 5. Abundância relativa percentual a nível de família para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.



A Figura 6 ilustra por meio de gráficos de *heatmaps* os filós e classes correlacionados e agrupados por amostras. Na parte superior dos gráficos estão identificadas as amostras por cores e agrupadas por dendrograma de acordo com os filós e classes correlacionados. A escala de cores adotada varia do frio ao quente, sendo as cores frias (tons de azul) indicadas para representar filós e classes com correlação baixa e as cores quentes (tons de amarelo a vermelho escuro) indicadoras daqueles que tiveram correlação positiva.

Figura 6. Análise de heatmap por classe (A) e família (B) de acordo com as abundâncias de acordo com as amostras ambientais para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.



Em (A) heatmap das correlações das abundâncias entre classes procarióticas das amostras de solo estudadas. Em (B) heatmap das correlações das abundâncias entre as famílias procarióticas as amostras de solo estudadas. BS sigla para amostras de solo adjacente (Bulk Soil) a numeração ao final marca a repetição amostral; RS sigla para amostras de solo rizosférico que é sucedida pelas iniciais da espécie de planta hiperacumuladora de níquel da qual foi coletado, sendo JL para *J. lanstykii* e LL para *L. lupulina*.

Observa-se que o clado 1 apresenta o maior número de correlações positivas com as amostras rizosféricas, com exceção de táxons sem assinatura taxonômica que apresentou forte correlação com o solo adjacente. Os membros do segundo clado apresentaram correlação de média a baixa, tendo como principais filos correlacionados Spirochaetota e Chloroflexota associados ao solo adjacente. Os clados 3 e 4 apresentaram correlação baixa a ausente para todas as amostras.

A nível de classe, a análise revelou um padrão de correlação distinto entre as amostras do solo adjacente e as amostras das rizosferas das espécies *J. lanstykii* e *L. lupulina* (eixo x na parte superior), no qual foram formados três clados. Ao longo do eixo y observa-se a formação de cinco clados. O clado 1 agrupa as classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, e classes não identificadas relacionadas a Spirochaetota; O clado 2 agrupa as classes Methylophilum, Gemmatimonadetes e Anaerolineae; O clado 3 agrupa as classes Verrucomicrobiae, Thermoleophilia, Actinomycetia, Blastocatellia e classes sem assinatura; O

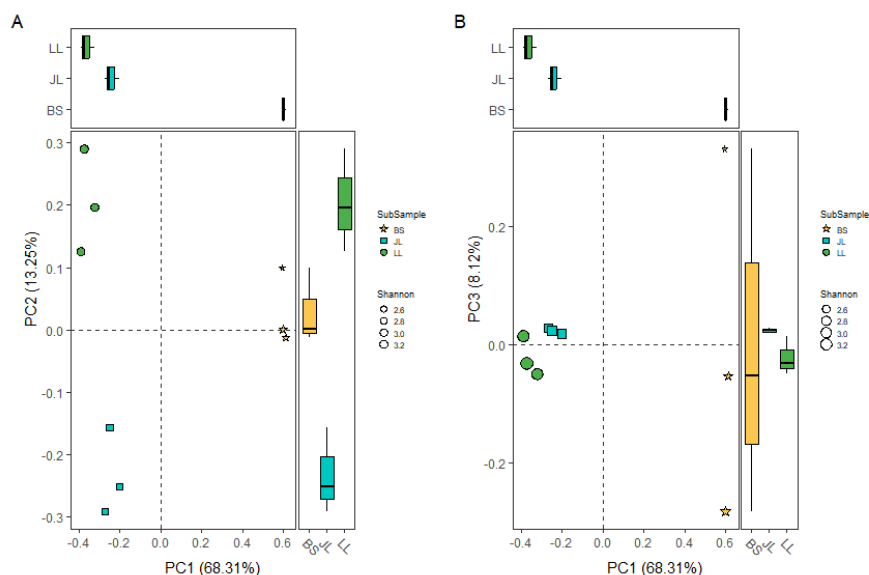
clado 4 agrupa as classes Dehalococcoidia, Clostridia e classes sem assinaturas pertencentes a Firmicutes; O clado 5 agrupa as classes Planctomycetia, Myxococcia, UBA1551, Dormibacteria, Acidobacteriae e Ktedonobacteria.

A análise revelou que os integrantes do clado 3 estiveram positivamente correlacionados, porém com correlações distintas. Verrucomicrobiae, Thermoleophilia, Actinomycetia e Blastocatellia demonstraram correlação moderada com a rizosfera das espécies e baixa correlação com o solo adjacente. Classes sem assinatura taxonômica mostraram correlações mais fortes com o solo adjacente em comparação com a rizosfera das espécies.

3.4.3 Análise de beta diversidade do microbioma

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi empregada para examinar a estrutura da comunidade microbiana em nichos rizosféricos derivados de plantas de *L. lupulina* e *J. lanstykii*, juntamente com amostras do solo adjacente (Figura 7 A e B). A distribuição espacial das amostras delineou aglomerados claros, indicativos de perfis microbianos díspares inerentes aos microambientes rizosféricos versus o solo adjacente. Significativamente, amostras rizosféricas provenientes de duas espécies de plantas distintas manifestaram agrupamentos discretos, marcados por dissimilaridades pronunciadas em suas composições microbianas. A análise ressaltou a poderosa influência exercida pelas espécies de plantas na beta diversidade das assembleias microbianas rizosféricas.

Figura 7. Análise de PCoA (Principal Coordinates Analysis) utilizando a distância de Bray-Curtis nos dados de abundância de acordo com as amostras ambientais para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia e no solo adjacente.



Cada ponto representa uma amostra, o tamanho do ponto representa a observação OTU da amostra. A cor do ponto representa o nome do grupo da amostra, com base no primeiro e no segundo componente acrescidos da diversidade por Shannon (A); Gráfico de PCoA com base no primeiro e terceiro componente acrescidos da diversidade por Shannon (B). BS sigla para amostras de solo adjacente (Bulk Soil) a numeração ao final marca a repetição amostral; RS sigla para amostras de solo rizosférico que é sucedida pelas iniciais da espécie de planta hiperacumuladora de níquel da qual foi coletado, sendo JL para *J. lanstykii* e LL para *L. lupulina*.

Os padrões distintos de agrupamento exibidos por amostras rizosféricas de *L. lupulina* e *J. lanstykii* sugerem divergências entre essas plantas e seus microbiomas cognatos. Após análise comparativa com amostras de solo adjacente, surgiu uma demarcação clara entre comunidades microbianas, acentuando a marca exclusiva da rizosfera na estrutura da arquitetura do microbioma. Este resultado acentua o impacto do meio rizosférico na modulação da estrutura microbiana, acentuando assim a especificidade e a capacidade adaptativa inerentes a estes microbiomas.

Foi realizada uma análise de PCoA usando a métrica de distância ou dissimilaridade de Bray-Curtis para comparar as amostras de microbiomas. As coordenadas principais foram plotadas em um gráfico de bidimensional, e a porcentagem de variação explicada por cada eixo

foi calculada. Foi realizado um teste de distâncias Hellinger para testar a hipótese de que a composição do microbioma está associada as amostras em estudo.

O gráfico de PCoA mostra a distribuição das amostras de microbiomas no espaço de coordenadas principais. Os eixos principais P1 e P2 explicaram 88,76% da variabilidade total. Os eixos P1 e P3 explicaram 76,46% da variabilidade total. A porcentagem de variação explicada pelo primeiro eixo principal foi de 79 %, e pelo segundo eixo principal foi de 9,76 %. O teste de Bray-Curtis indicou que há uma associação significativa entre a composição do microbioma e as espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel endêmicas dos solos ultramáficos da Niquelândia ($p < 0,01$). A análise gráfica também evidencia (em B) maiores índices de diversidade observada e pelo índice de Shannon atreladas as amostras da rizosfera das espécies *J. lanstykii* e *L. lupulina*.

A análise de PCoA revelou que há uma diversidade beta significativa entre as amostras de microbiomas, e que essa diversidade está relacionada à rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel, sendo derivadas do solo adjacente. Esse resultado sugere que o microbioma pode ter um papel importante na determinação ou na modulação da acomodação e adaptabilidade ambiental das espécies vegetais endêmicas presentes em sítios ultramáficos.

3.4.4 Modelo de Random Forest

A figura 8 apresenta os desdobramentos de um modelo de *random forest* empregado na classificação do microbioma de amostras de solo conforme sua origem: solo adjacente (BS), rizosfera de *J. lanstykii* (JL) e rizosfera de *L. lupulina* (LL). Observa-se que o erro do modelo decresce à medida que o número de árvores na floresta aumenta. Com 500 árvores, o erro atinge aproximadamente 0,2, indicando uma capacidade de classificação correta de 80% das amostras. A análise de erros por tipo de amostra revela que o modelo é mais preciso para amostras de solo bulk (BS). Com 500 árvores, o erro para amostras BS é de aproximadamente 0,1, enquanto o erro para amostras JL e LL é de cerca de 0,25.

Uma análise detalhada dos erros por tipo de amostra destaca que o modelo classifica corretamente 90% das amostras BS, 75% das amostras JL e 67% das amostras LL com 500 árvores. O desafio na classificação das amostras LL pode ser atribuído a uma combinação de fatores, incluindo a menor quantidade de dados e a maior variabilidade na comunidade de micro-organismos dessa rizosfera.

A avaliação do erro OOB (Out-of-Bag) revela um erro de 0,111 para 500 árvores, indicando que o modelo é capaz de classificar corretamente 88,9% das amostras que não foram

utilizadas para treinamento, demonstrando sua robustez. Esses resultados ressaltam a importância de considerar a origem das amostras ao interpretar os resultados do modelo de *random forest*, fornecendo insights valiosos sobre a eficácia do mesmo na discriminação entre diferentes comunidades microbianas.

A partir do gráfico na Figura 9, é possível inferir que as famílias bacterianas SG8_39, GWC2_71_9, Solirubrobacteraceae_405343 e CSP1_6 são as mais importantes na classificação das amostras de solo. Para o grupo de amostras BS as três principais famílias relacionadas pelo modelo foram Ketodonobacteraceae, SbA1 e Sphingomonadaceae. Para o grupo de amostras JL as três principais famílias relacionadas pelo modelo foram Gaiellaceae, Geodermatophilaceae e Chthoniobacteraceae. Para o grupo de amostras LL as três principais famílias relacionadas pelo modelo foram Ketodonobacteraceae, SbA1 e Sphingomonadaceae.

Figura 8. Desdobramentos de um modelo de *random forest* com 500 árvores empregado na classificação do microbioma de amostras de solo conforme sua origem de acordo com as amostras ambientais para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyiakii* endêmicas da Niquelândia e do solo adjacente.

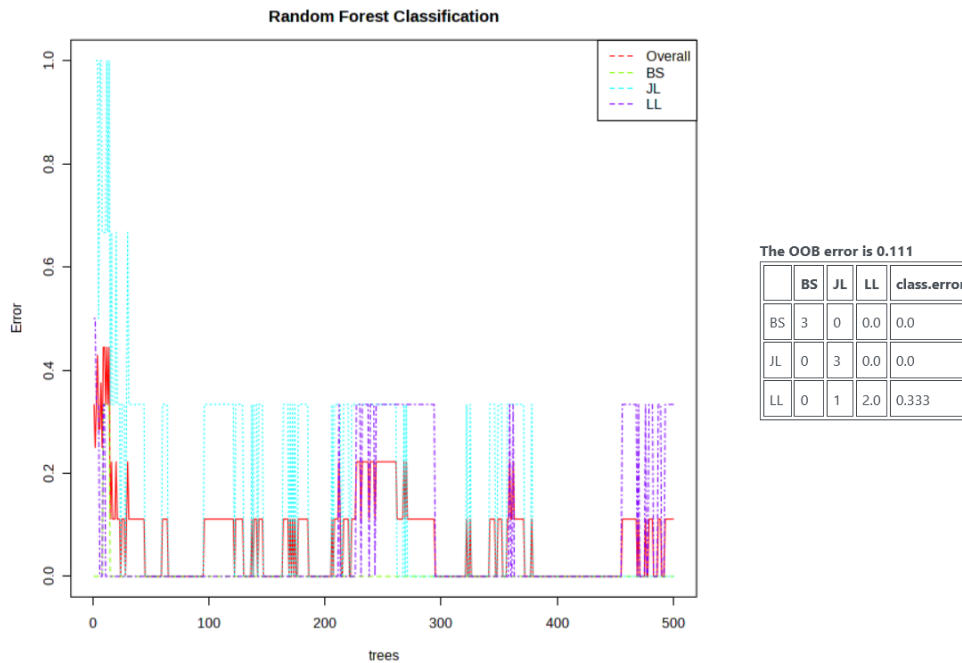
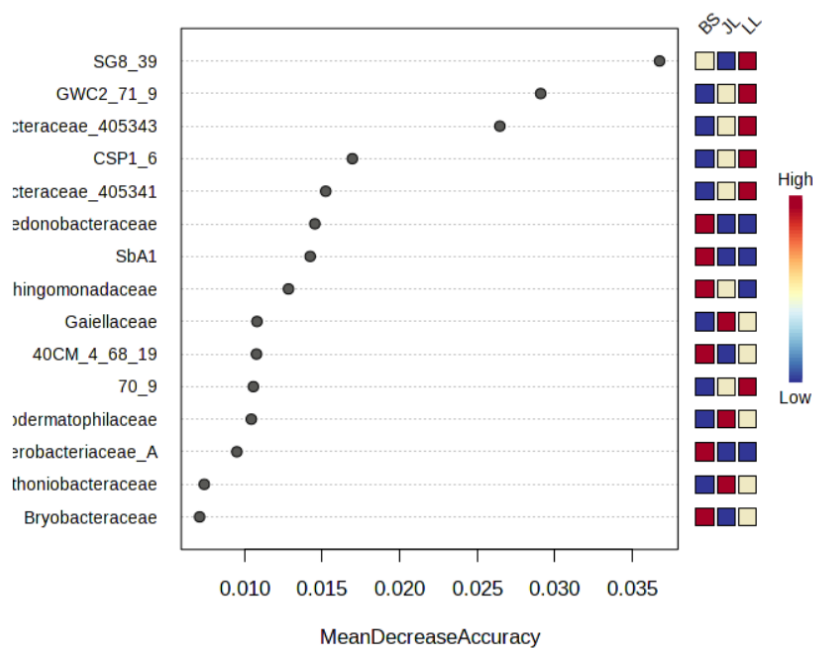


Figura 9. Visualização gráfica da eficácia do modelo Random Forest com 500 árvores empregado na classificação do microbioma de amostras de solo conforme sua origem de acordo com as amostras ambientais para os dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA das amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyiakii* endêmicas da Niquelândia e do solo adjacente.



A Figura 9 representa os resultados de um modelo de Random Forest para a análise de sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA em diferentes amostras de solo. As amostras incluem Solo Bruto (BS), Rizosfera de *J. lanstykii* (JL) e Rizosfera de *L. lupulina* (LL). Os pontos no gráfico representam a importância das características (famílias bacterianas) na predição das categorias das amostras, medida pela Diminuição Média da Acurácia. A barra à direita indica a presença relativa dessas famílias nas três categorias de amostras.

Cada ponto no gráfico principal corresponde à importância relativa de uma família bacteriana específica. As famílias bacterianas identificadas ou não atribuídas durante a análise estão listadas no eixo Y. O eixo X representa a Diminuição Média da Acurácia, uma métrica que indica a importância relativa dessas famílias na classificação das amostras. A presença relativa dessas famílias nas três categorias de amostras pode ser vista na barra à direita do gráfico principal.

3.4.4 Análise de network

A análise de Network utilizando o programa Gephi, com base nos dados da tabela de OTUs e empregando a correlação de Spearman entre as OTUs, revelou informações significativas sobre a estrutura e interconexão das comunidades microbianas. Os resultados referentes as propriedades da network verificados pela análise podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros topológicos e propriedades da network do microbioma dos solos ultramáficos de Niquelândia.

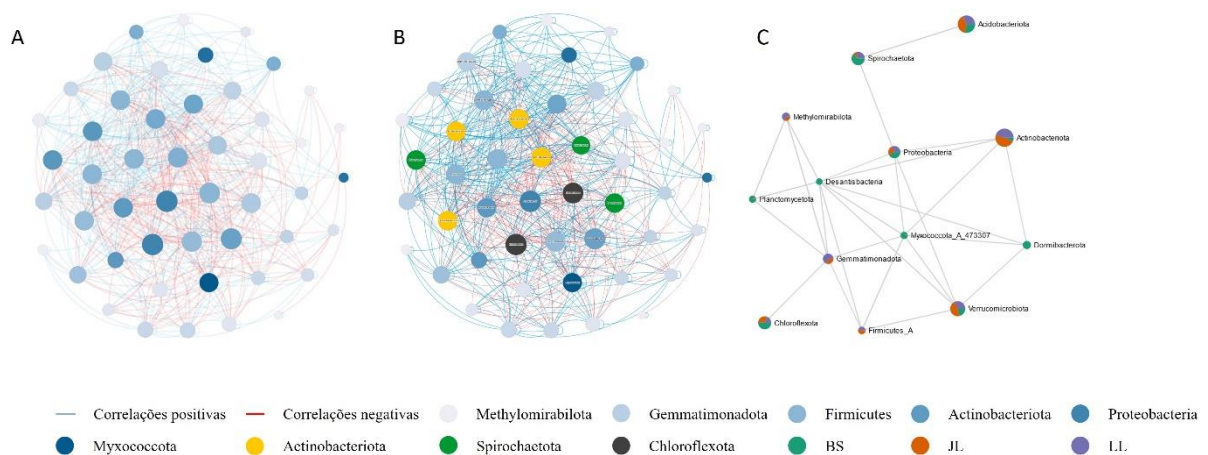
Parâmetros Topológicos	Valores de Network
Número de nós ¹	49
Número de linhas ²	572
Linhas positivas ³	348
Linhas negativas ⁴	224
Modularidade ⁵	2,186
Número de comunidades ⁶	24
Diâmetro da network ⁷	5
Comprimento médio do caminho ⁸	1,714
Grau médio ⁹	23,347
Média do coeficiente de agrupamento ¹⁰	0,757

¹Número de nós: Representa o total de elementos na rede; ²Número de linhas: Indica o total de conexões entre as OTUs na rede, refletindo as interações entre as diferentes unidades taxonômicas; ³Linhas positivas: Refere-se ao número de conexões positivas, indicando associações positivas entre as OTUs; ⁴Linhas negativas: Representa o número de conexões negativas, indicando possíveis relações de competição ou inibição entre as OTUs; ⁵Modularidade: Medida que avalia a qualidade da divisão da rede em comunidades ou módulos, indicando a presença de agrupamentos distintos; ⁶Número de comunidades: Indica quantos grupos ou comunidades distintas foram identificados na rede; ⁷Diâmetro da network: Reflete a distância máxima entre dois nós na rede, indicando o tamanho da rede; ⁸Comprimento médio do caminho: Média das distâncias entre todos os pares de nós, fornecendo uma medida da eficiência da comunicação na rede; ⁹Grau médio: Representa a média dos graus (número de conexões) de todos os nós na rede; ¹⁰Média do coeficiente de agrupamento: Indica a propensão dos vizinhos de um nó estarem interconectados.

A rede gerada consiste em 49 nós, representando as diferentes OTUs, e 572 linhas que denotam as correlações entre essas unidades taxonômicas. Dessas linhas, 348 são positivas, indicando associações positivas entre as OTUs, enquanto 224 são negativas, sugerindo relações negativas (Figura 10). A modularidade de 2,186 sugere que a rede de interações microbianas é modular, ou seja, composta por subcomunidades distintas. Cada módulo pode representar uma comunidade microbiana funcionalmente especializada ou uma resposta a condições ambientais específicas. A network foi dividida em 24 comunidades, destacando a complexidade e a especialização funcional das relações entre as OTUs. O diâmetro da network, que representa a

distância máxima entre dois nós, é de 5, indicando uma proximidade relativa entre as diferentes unidades taxonômicas. O comprimento médio do caminho, calculado em 1,714, sugere uma eficiente conectividade entre as OTUs na rede.

Figura 10. Gráficos da análise de network gerados a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos a partir de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.



(A) Gráfico de network do microbioma do solo derivado de rocha ultramáfica na Niquelândia ilustrando as relações positivas (linhas em azul) e negativas (linhas em vermelho). O tamanho dos nós, bem como a intensidade de cor foram ajustados de acordo com o grau e a influência significativa dos nós-chaves no fluxo de informações e na comunicação eficiente dentro da network; (B) Detalhamento do gráfico de network do microbioma do solo derivado de rochas ultramáficas da Niquelândia, mostrando relações positivas (linhas em azul) e negativas (linhas em vermelho). Os nós identificados representam membros com alto grau e influência, destacando sua importância no fluxo de informações e comunicação na network; (C) Detalhamento do gráfico de network do microbioma do solo derivado de rochas ultramáficas da Niquelândia, mostrando o percentual de abundância por filo e suas correlações entre os nichos edáficos, bem entre os filós.

O grau médio, representando o número médio de conexões para cada nó, é de 23,347, indicando uma rede densamente interconectada. A média do coeficiente de agrupamento, avaliando a tendência de nós semelhantes se agruparem, é de 0,757, ressaltando a presença de agrupamentos e a formação de estruturas mais densas em certas regiões da network.

Esses resultados fornecem uma visão abrangente das interações microbianas, destacando padrões de cooperação e competição dentro do microbioma. A estrutura modular da rede sugere uma organização complexa, enquanto a presença de comunidades distintas destaca a especialização microbiana em nichos específicos. Essa análise de Network contribui para uma compreensão mais profunda da dinâmica microbiana no contexto estudado.

3.4.5 Análise de predição funcional do metagenoma

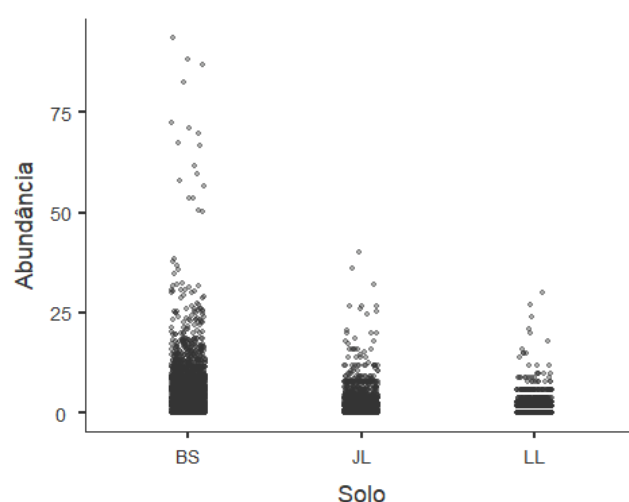
O resultado da análise de predição de metagenoma retornou 1165 *EC numbers* (Anexo I). Foram analisados 3495 dados de abundância relativa referente as enzimas identificadas para cada grupo amostral (BS, JL e LL). O teste de Tukey ($p < 0,05$) revelou diferenças significativas entre as abundâncias para os grupos amostrais. As maiores abundâncias na predição foram para o solo adjacente (BS) com média de 5,253, sendo a rizosfera de *J. lanstykii* o segundo maior nicho de predição com média de 1,917 e a rizosfera de *L. lupulina* o menor entre eles com média de 0,979 (Tabela 4, Figura 11).

Tabela 4. Estatísticas descritivas das abundâncias relativas das enzimas gerados a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos a partir de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.

Solo	N	Média	Tukey (0,05)	Mediana	Desvio-padrão	Amplitude	Mínimo	Máximo
BS	3495	5.253	A	4.00	6.83	93.4	0.00	93.4
JL	3495	1.917	B	2.00	2.80	40.0	0.00	40.0
LL	3495	0.979	C	0.00	1.91	30.0	0.00	30.0

BS: sigla para amostras de solo adjacente (Bulk Soil); JL: sigla para o conjunto de amostras da rizosfera de *J. lanstykii*; LL: sigla para o conjunto de amostras da rizosfera de *L. lupulina*.

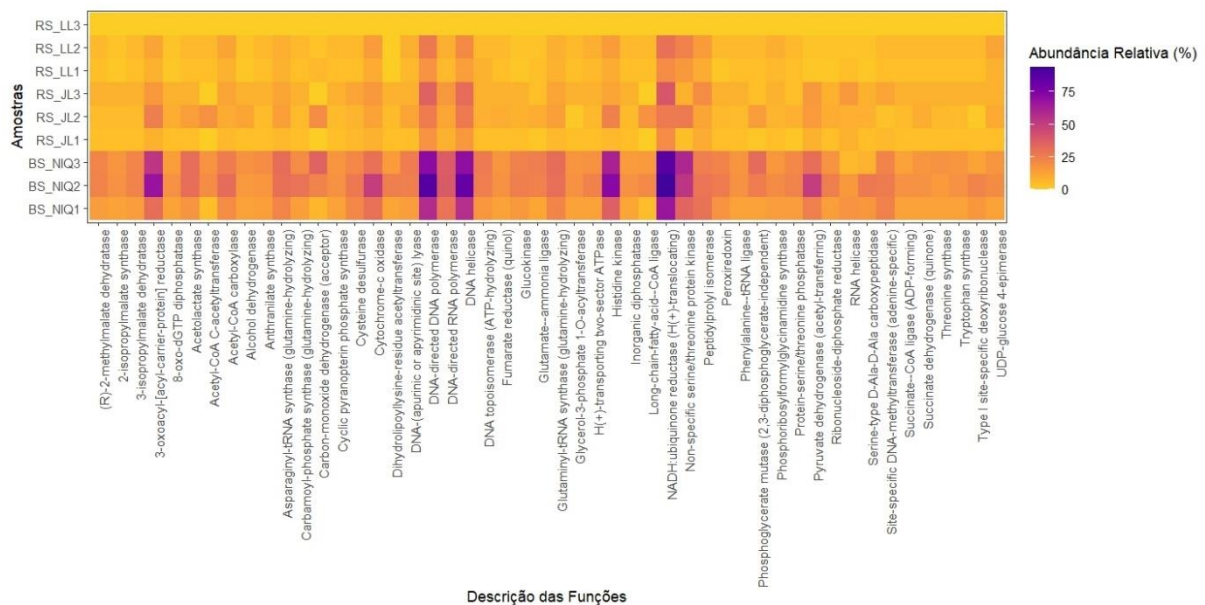
Figura 11. Gráfico de dispersão das abundâncias relativas das enzimas gerados a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos a partir de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.



BS: sigla para amostras de solo adjacente (Bulk Soil); JL: sigla para o conjunto de amostras da rizosfera de *J. lanstykii*; LL: sigla para o conjunto de amostras da rizosfera de *L. lupulina*.

A Figura 12 apresenta o *heatmap* com a abundância relativa das 50 funções enzimáticas de maior abundância. As linhas representam as amostras de solo, sendo três grupos principais: BS, JL e LL. As colunas representam as descrições das funções enzimáticas. As cores no *heatmap* indicam a abundância relativa percentual dessas funções, variando do amarelo (baixa abundância) ao roxo escuro (alta abundância). Observam-se padrões distintos de abundância entre os grupos de amostras.

Figura 12. Gráfico de *heatmap* contendo as 50 funções mais abundantes identificadas pelo PICRUST e as respectivas abundâncias relativas por amostra a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.



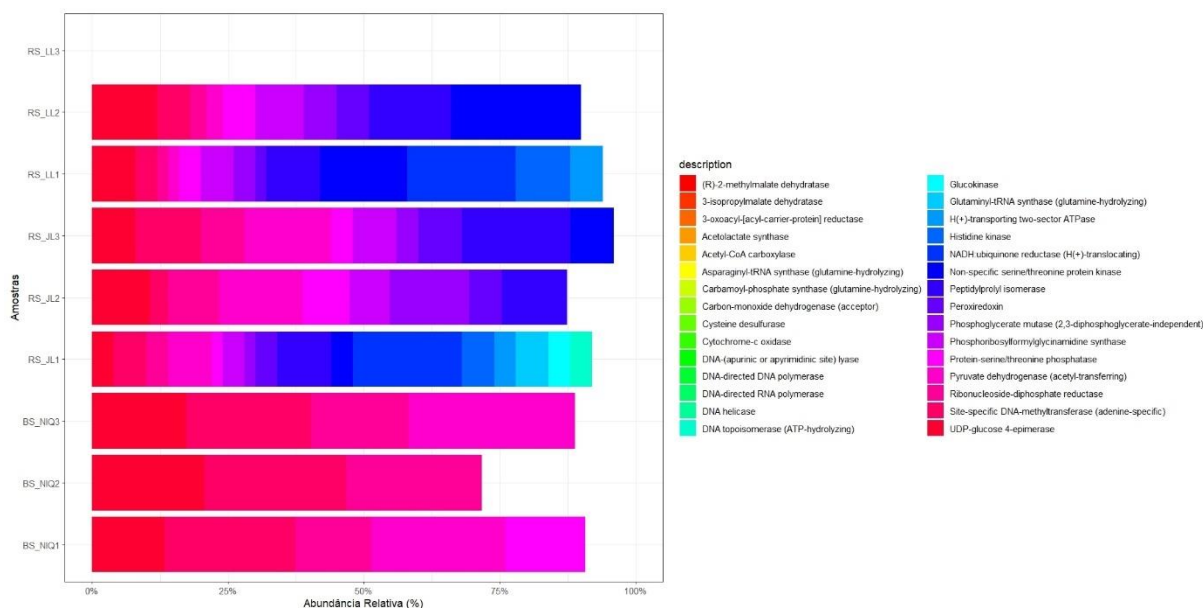
BS sigla para amostras de solo adjacente (Bulk Soil) a numeração ao final marca a repetição amostral; RS sigla para amostras de solo rizosférico que é sucedida pelas iniciais da espécie de planta hiperacumuladora de níquel da qual foi coletado, sendo JL para *J. lanstykii* e LL para *L. lupulina*.

As dez principais enzimas previstas com maior abundância foram: NADH:ubiquinona reductase (H(+)-translocadora), DNA polimerase dirigida, DNA helicase, histidina quinase, proteína quinase serina/treonina não específica, 3-oxoacil-[acil-transportador -proteína] reductase, Citocromo-c oxidase, RNA polimerase dirigida por DNA, Peptidilprolil isomerase e Piruvato desidrogenase (acetil transferase). De forma geral, as amostras do grupo BS apresentaram maiores abundâncias de certas funções enzimáticas, evidenciadas pelas regiões com cores mais escuras no *heatmap*. Por outro lado, as amostras dos grupos JL e LL exibem abundâncias relativamente menores para essas mesmas funções, com cores mais claras no

heatmap. No entanto, também é possível notar algumas funções enzimáticas com abundâncias mais altas nos grupos JL e LL em comparação com o grupo BS, indicadas por regiões mais escuras nesses grupos.

A Figura 13 apresenta um gráfico de barras empilhadas que ilustra as 30 principais funções procarióticas identificadas pelo PICRUSt, com suas respectivas abundâncias relativas por amostra. Observa-se que os padrões das enzimas verificadas no solo adjacente divergem do solo rizosférico de ambas espécies. O solo rizosférico apresenta proporções maiores das enzimas NADH ubiquinona redutase, kinases e ATPases. O solo adjacente é predominantemente composto por epimerase, metiltransferase, ribonucleosídeo difosfato redutase e piruvato desidrogenase.

Figura 13. Gráfico de barras empilhadas contendo as 30 funções mais abundantes identificadas pelo PICRUSt e as respectivas abundâncias relativas por amostra a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.



As enzimas predominantemente identificadas são responsáveis por funções relacionadas ao metabolismo, produção de aminoácidos e hormônios, bem como participam de processos de replicação, tradução e transcrição do DNA (Tabela 5). A Figura 14 apresenta as vias metabólicas principais e auxiliares identificadas pela análise de predição metagenômica. Percebe-se que as funções se concentram no metabolismo de carboidratos, aminoácidos, terpenoides, energético e metabolismo de vitaminas e cofatores.

Tabela 5. Descrição das funções, substratos e produtos das 30 principais enzimas identificadas pelo PICRUST a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.

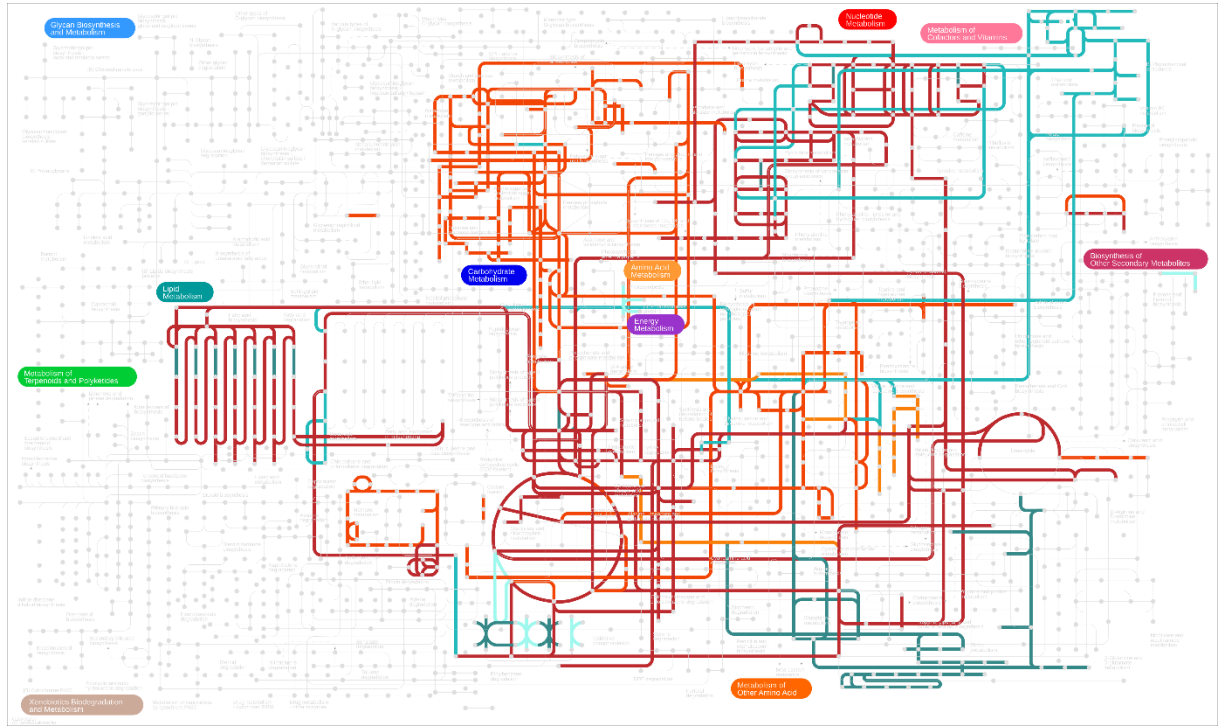
Enzima	Função	Substrato	Produto
NADH:ubiquinona redutase (H(+)-translocating)	<i>O transporte reverso de elétrons através desta enzima pode reduzir NAD+ a NADH.</i>	NADH, ubiquinone	NAD+, ubiquinol
DNA-directed DNA polymerase	<i>A principal função da DNA polimerase é sintetizar DNA a partir de desoxirribonucleotídeos, os blocos de construção do DNA.</i>	DNA molde, dNTPs	DNA nova fita
DNA helicase	<i>A função da DNA helicase é reconhecer a origem de replicação e desenrolar a dupla-hélice de DNA, na forquilha de replicação.</i>	DNA fita dupla	DNA fita simples
Histidina kinase	<i>Sistema quimiorreceptor em bactérias e persistiu em fungos e plantas, onde é usado para detectar a osmolaridade e alguns hormônios, respectivamente.</i>	Histidina	Histidina fosforilada
Não específica serine/threonine protein kinase	<i>As serina/treonina quinases desempenham um papel na regulação da proliferação celular, morte celular programada (apoptose), diferenciação celular e desenvolvimento embrionário.</i>	Proteína, ATP	Proteína fosforilada, ADP
3-oxoacyl-[acyl-carrier-proteína] reductase	<i>Proteína transportadora de 3-cetoacil-acil redutase, uma enzima da biossíntese de ácidos graxos encontrada em muitas espécies de plantas e bactérias.</i>	3-oxoacyl-ACP, NADPH	Hidroxyacyl-ACP, NADP+
Cytochromo-c oxidase	<i>Reduzem o oxigênio molecular para produzir água e gerar conservação de energia pela formação de um gradiente eletroquímico transmembrana que impulsiona a síntese de ATP e outros processos que exigem energia nas células.</i>	Citocromo c reduzido, O ₂	Citocromo c oxidado, H ₂ O
Peptidylprolyl isomerase	<i>Catalisa a isomerização de ligações peptídicas prolina</i>	Peptídeo com prolina	Peptídeo com prolina isomerizada
Piruvato desidrogenase (acetil-transferente)	<i>Converte piruvato em acetil-CoA</i>	Piruvato	Acetil-CoA
Glutaminil-tRNA sintetase (glutamina-hidrolisante)	<i>Liga glutamina ao tRNA</i>	Glutamina + tRNA	Glutaminil-tRNA
Asparaginil-tRNA sintetase (glutamina-hidrolisante)	<i>Liga asparagina ao tRNA</i>	Asparagina + tRNA	Asparaginil-tRNA
Acetil-CoA carboxilase	<i>Converte acetil-CoA em malonil-CoA</i>	Acetil-CoA + CO ₂	Malonil-CoA
Acetolactato sintase	<i>Converte piruvato e ácido acético em acetolactato</i>	Piruvato + ácido acético	Acetolactato
Cisteína desulfurase	<i>Remove o enxofre da cisteína</i>	Cisteína	H ₂ S + alanina
DNA-metiltransferase (adenina-específica)	<i>Adiciona um grupo metil à adenina do DNA</i>	DNA + S-adenosil metionina	DNA metilado + S-adenosil homocisteína
DNA-(apurínico ou apirimidínico sítio) liase	<i>Remove nucleotídeos danificados do DNA</i>	DNA danificado	DNA reparado

Continua na próxima folha

Continuação da
Tabela 5

DNA topoisomerase (ATP-hidrolisante)	<i>Altera a topologia do DNA</i>	DNA	DNA com topologia alterada
Fosfoglicerato mutase (2,3-bisfosfoglicerato-independente)	<i>Converte 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato</i>	3-Fosfoglicerato	2-Fosfoglicerato
Monóxido de carbono desidrogenase (aceptor)	<i>Oxida monóxido de carbono a dióxido de carbono</i>	CO + H ₂ O	CO ₂ + H ₂
UDP-glicose 4-epimerase	<i>Converte UDP-glicose em UDP-galactose</i>	UDP-glicose	UDP-galactose
Peroxiredoxin	<i>Reduz peróxidos de hidrogênio</i>	Peróxido de hidrogênio	H ₂ O
Carbamoil-fosfato sintetase (glutamina-hidrolisante)	<i>Converte carbamato em carbamoil-fosfato</i>	Carbamoil-fosfato + H ₂ O	Carbamoil-fosfato + NH ₃
Glucocinase	<i>Fosforila glicose a glicose-6-fosfato</i>	Glicose + ATP	Glicose-6-fosfato + ADP
H(+)-transportando ATPase de dois setores	<i>Transporta íons H⁺ através da membrana plasmática</i>	ATP + H ₂ O	ADP + Pi + H ⁺
3-Isopropilmalato desidratase	<i>Converte 3-isopropilmalato em metil-acetoacetyl-CoA</i>	3-Isopropilmalato	Metil-acetoacetyl-CoA
(R)-2-metilmalato desidratase	<i>Converte (R)-2-metilmalato em ácido pirúvico</i>	(R)-2-Metilmalato	Ácido pirúvico
Fosforibosilformilglicinamida sintase	<i>Converte 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo em fosforibosilformilglicinamida</i>	5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo + ATP	Fosforibosilformilglicinamida + ADP + Pi
Proteína-serina/treonina fosfatase	<i>Remove grupos fosfato de proteínas</i>	Fosfoproteína	Proteína + Pi
Ribonucleosídeo-difosfato redutase	<i>Converte ribonucleosídeo-difosfatos em desoxirribonucleosídeo-trifosfatos</i>	Ribonucleosídeo-difosfato + NADPH + H ⁺	Desoxirribonucleosídeo-trifosfato + NADP ⁺ + H ₂ O

Figura 14. Vias metabólicas das 30 principais enzimas identificadas pelo PICRUSt a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.



Os ciclos biogeoquímicos do carbono, metano, nitrogênio, fósforo e enxofre foram avaliados quanto a proporção das enzimas identificadas pelo PICRUSt a partir dos dados de sequenciamento (Figura 15).

Figura 15. Abundância relativa proporcional percentual das enzimas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos do carbono, metano, nitrogênio, fósforo e enxofre identificadas pelo PICRUST a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies das plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.



No solo adjacente as enzimas relacionadas a ciclagem do carbono foram predominantes, compondo cerca de 50% da proporção das enzimas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos do carbono, metano, nitrogênio, fósforo e enxofre. Proporcionalmente, as enzimas relacionadas a ciclagem do fósforo foram a segunda maior correspondência. Dessa forma, no solo adjacente, a proporção de enzimas agrupadas por biociclo fora ordenada na seguinte ordem decrescente: carbono, fósforo, metano, enxofre e nitrogênio. As principais vias utilizadas na ciclagem carbono foram as vias redutiva do ciclo do citrato e 3-hidroxipropionato biociclo. A principal via predita para a ciclagem do metano foi a assimilação de formaldeído (ribulose monofosfato). O

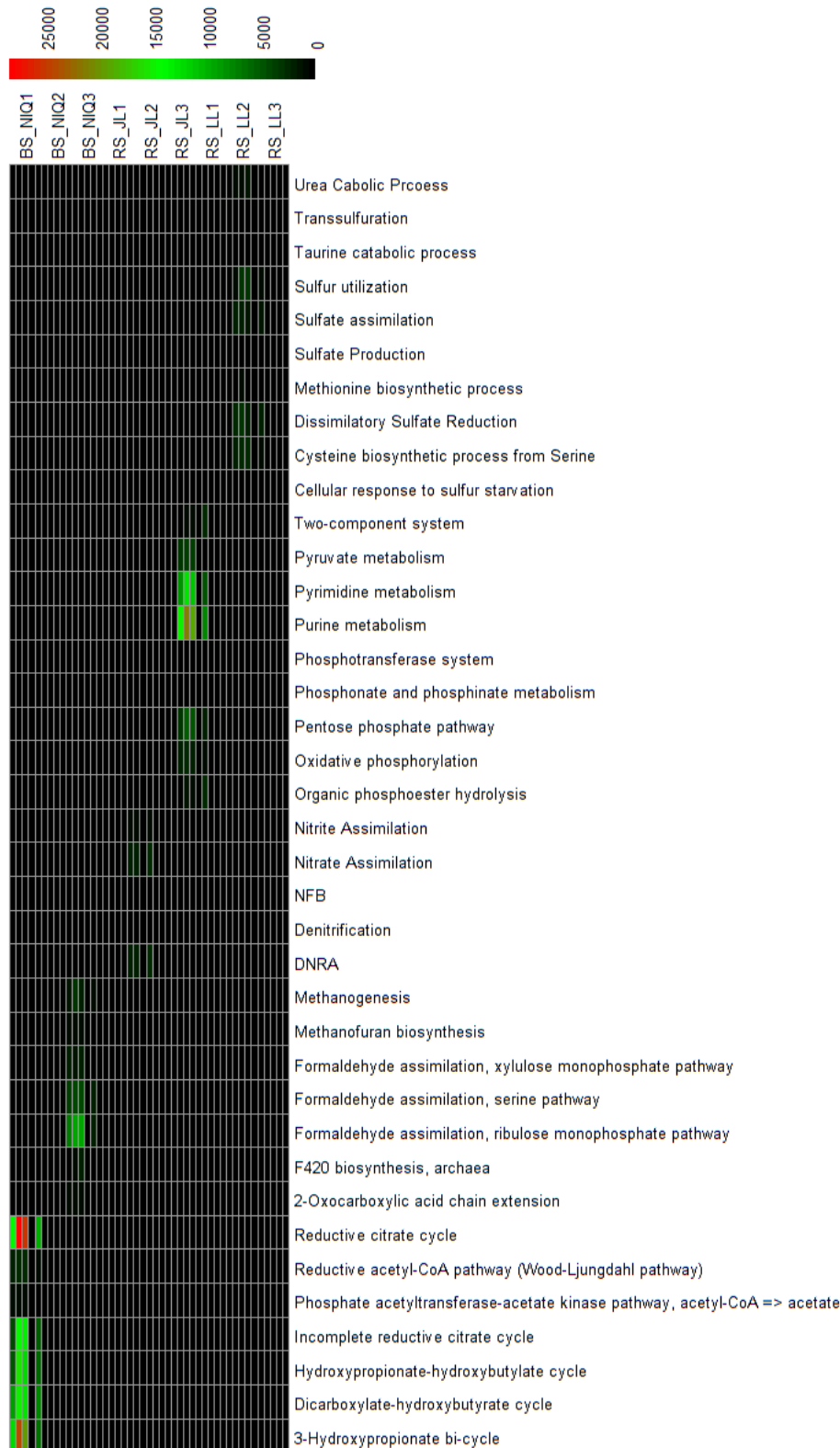
metabolismo de purina foi a principal via predita relacionada a ciclagem do fósforo. A via de redução dissimilatória do sulfato e a utilização de enxofre foram as principais relacionadas ao ciclo do enxofre.

O solo da rizosfera de *J. lanstykii* apresentou como principais enzimas relacionadas a ciclagem de nutrientes àquelas ligadas aos ciclos do carbono e fósforo, compondo cerca de 75% da abundância relativa de enzimas por biociclo. Enzimas relacionadas ao ciclo do enxofre demonstram a terceira maior abundância. Entretanto, enzimas ligadas a ciclagem do nitrogênio revelaram abundância menor que 10%. As principais vias utilizadas na ciclagem carbono foram as vias reductiva do ciclo do citrato, ciclo dicarboxilato-hidroxi-butirato e 3-hidroxi-propionato biciclo. A principal via predita para a ciclagem do metano foi a assimilação de formaldeído (ribulose monofosfato). O metabolismo de purina foi a principal via predita relacionada a ciclagem do fósforo. A via de resposta celular à privação de enxofre e a redução dissimilatória do sulfato foram as principais relacionadas ao ciclo do enxofre.

O solo da rizosfera de *L. lupulina* apresentou como principais enzimas relacionadas a ciclagem de nutrientes àquelas ligadas aos ciclos do carbono, compondo mais de 50% da abundância relativa de enzimas por biociclo. Enzimas relacionadas ao ciclo do fósforo demonstram a terceira maior abundância. Entretanto, enzimas ligadas a ciclagem do nitrogênio e enxofre revelaram abundância relativa de 25% e menor que 10%, respectivamente. As principais vias utilizadas na ciclagem carbono foram as vias reductiva do ciclo do citrato e 3-hidroxi-propionato biciclo. A principal via predita para a ciclagem do metano foi a assimilação de formaldeído (ribulose monofosfato). O metabolismo de purina foi a principal via predita relacionada a ciclagem do fósforo. A via de utilização do enxofre, assimilação do enxofre e a redução dissimilatória do sulfato foram as principais relacionadas ao ciclo do enxofre.

A identificação das vias com maiores abundâncias correspondentes relacionadas aos ciclos biogeoquímicos do carbono, metano, nitrogênio, fósforo e enxofre identificadas pelo PICRUS_t podem ser visualizadas de forma completa por meio do gráfico *heatmap* disposto na Figura 16.

Figura 16. Heatmap das principais vias identificadas para os ciclos biogeoquímicos do carbono, metano, nitrogênio, fósforo e enxofre identificadas pelo PICRUSt a partir dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA de grupos procarióticos de amostras de solo derivados de rochas ultramáficas e de amostras de solo da rizosfera das espécies das plantas hiperacumuladoras de níquel *J. lanstykii* e *L. lupulina*.



3.5 Discussão

O presente estudo busca avançar no entendimento da complexidade que envolve universo microbiano presente em solos derivados de rochas ultramáficas, bem como aqueles associados às espécies vegetais endêmicas desses sítios. A incipiência de estudos acerca dessa temática é reflexo tanto da complexidade envolvendo os processos de análise, quanto da raridade de ocorrência desses solos a nível de mundo. Assim, o presente trabalho configura um avanço em direção ao microbioma presente em nichos ultramáficos no Brasil e que pode refletir em estratégias agrícolas.

Com base nos índices de diversidade avaliados, foi possível perceber que as amostras de solos rizosféricos apresentaram maiores índices em comparação com o solo adjacente. Portanto, infere-se que a riqueza seja maior na rizosfera das espécies vegetais avaliadas em comparação com o solo naturalmente ultramáfico sem vegetação. Analisando os índices de diversidade, é possível verificar que a rizosfera de *L. lupulina* abriga uma maior riqueza de espécies, seguido pela rizosfera de *J. lanstykii*. Os menores índices de diversidade foram verificados no solo adjacente. A rizosfera pode exercer efeitos de enriquecimento ou depleção sobre comunidades microbianas. O enriquecimento microbiano já foi verificado na rizosfera de soja e milho. As flutuações no comportamento da diversidade associada aos nichos edáficos é resultado da interação entre a química do solo e o genótipo vegetal, bem como de sua atividade (ANCOUSTURE et al., 2023; ZHANG et al., 2023). Os microbiomas associados ao solo adjacente e à rizosfera exibem diferenças notáveis, sugerindo a presença de micro-organismos adaptados capazes de mitigar os efeitos adversos do estresse gerado por concentrações elevadas de metais e desequilíbrios nas proporções de Ca:Mg. Essa distinção nos microbiomas destaca a plasticidade e a especificidade dessas comunidades microbianas em resposta às condições únicas da rizosfera, onde a presença da planta influencia significativamente a dinâmica microbiana e, conseqüentemente, a ciclagem de metais e nutrientes (SENTHIL KUMAR et al., 2023).

A análise de beta diversidade evidenciou uma nítida distinção entre as comunidades presentes nas amostras analisadas neste estudo. O solo adjacente revelou divergências significativas tanto em termos de composição quanto de diversidade, quando comparado com os solos rizosféricos associados a ambas as espécies de plantas investigadas. Essa configuração resulta do impacto direto da rizosfera, que atua como um filtro seletivo, promovendo a adaptação de uma comunidade microbiana específica capaz de facilitar o estabelecimento e a

adaptação da espécie vegetal no ambiente (MARTOS et al., 2021). A ampliação da diversidade observada na rizosfera das espécies reflete não apenas o recrutamento ativo de microrganismos do solo circundante para compor o microbioma rizosférico, mas também a contribuição do microbioma herdado do genótipo vegetal durante o processo de propagação (ANCOUSTURE et al., 2023; BERG et al., 2020). Esses resultados corroboram a compreensão de que a rizosfera desempenha um papel vital na modelagem da estrutura microbiana, apresentando-se como um ambiente diferenciado e enriquecido em termos de diversidade e composição quando comparado ao solo adjacente. Essa dinâmica reflete interações complexas entre as plantas e os microrganismos do solo, evidenciando a influência significativa do microambiente rizosférico na conformação das comunidades microbianas associadas às plantas.

Os filos mais abundantes nas amostras de solo adjacente foram Acidobacteriota (23,5%), Spirochaetota (19%) e Chloroflexota (15,93%), os quais juntos correspondem a cerca de 60% da composição do microbioma dessas amostras. A ocorrência desses filos em solos derivados de rochas ultramáficas já foi registrada (IGWE; VANNETTE, 2019; KHILYAS et al., 2019). Entretanto, com menores índices percentuais de abundância. Acidobacteriota é um dos filos mais comuns em amostras de solo e é composto por bactérias capazes de degradar o carbono presente em polissacarídeos complexos como celulose e lignina (LOPEZ et al., 2020). Spirochaetota, um filo composto por bactérias anaeróbicas mesofílicas gram-negativas, demonstra habilidades versáteis na degradação de compostos complexos de carbono, além da capacidade de biossintetizar grupos de fosfato (HOOVER et al., 2003). Chloroflexota, constituído por bactérias fotossintéticas anaeróbicas gram-positivas, também conhecidas como bactérias verdes não sulfurosas, exibem capacidades como a oxidação de carbono, fixação de CO₂ e degradação de compostos xenobióticos, como alguns organoclorados (THIEL et al., 2019). Esses resultados corroboram a riqueza desses filos no contexto específico do solo adjacente, evidenciando sua contribuição para processos essenciais no ciclo biogeoquímico do carbono e na adaptação a condições específicas de solos derivados de rochas ultramáficas.

A composição do microbioma rizosférico revelou padrões distintos em relação ao solo adjacente. Ambas as espécies apresentaram como principais filos associados às suas rizosferas Actinobacteriota, Acidobacteriota e Verrucomicrobia que compunham cerca de 79% da comunidade total de *J. lanstykii* e 73% da comunidade de *L. lupulina*. Actinobacteriota, Acidobacteriota e Verrucomicrobia estão entre os filos mais abundantes e recorrentes em pesquisas envolvendo a rizosfera em ecossistemas serpentinos (SENTHIL KUMAR et al., 2023). Entretanto, as altas proporções encontradas denotam uma conformação de microbioma particular dessas espécies endêmicas da Niquelândia.

Actinobactérias representam cerca de 30% do total de microbiomas do solo e são extremamente importantes na reciclagem do carbono, decomposição de biomassa animal e vegetal e manutenção da saúde e fertilidade do solo. Actinobactérias também são capazes de crescer em ambientes extremos devido sua tendência de esporulação em ambientes estressantes, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares e metabólitos secundários (BOUBEKRI et al., 2022).

Verrucomicrobia é considerado o quarto filo mais abundante em ecossistemas de solo, correspondendo até 23% da composição de solos a nível de mundo. Bactérias pertencentes ao filo Verrucomicrobia são caracterizadas por possuírem hidrolases capazes de degradar polissacarídeos. Além disso, análises metagenômicas revelaram genes relacionados a síntese do citocromo c, sugerindo que membros desse grupo são potenciais transferidores de elétrons extracelulares (FUERST, 2019).

Apesar disso, os filios anteriormente descritos são apenas parte da composição do microbioma dessas espécies. Outros dois filios presentes nas amostras de solos rizosféricos foram Spirochaetota e Chloroflexota. O filo Spirochaetota é composto por bactérias gram-negativas que possuem células alongadas e enroladas helicoidalmente. Bactérias pertencentes a este filo são de metabolismo quimiorganotrófico e algumas espécies são patogênicas para humanos e animais. Outras funções associadas a esses filios são: decomposição da matéria orgânica do solo, fixação biológica de nitrogênio, ciclagem do carbono e melhoria da estrutura do solo devido a produção de exopolissacarídeos (HAAKE, 2009; HOOVER et al., 2003; LEE et al., 2013). Dessa forma, filios com menor representação também configuram importantes atores que podem contribuir para uma visão holística da ecologia microbiana associada a *J. lanstyaki* e *L. lupulina*.

Os resultados da análise do solo adjacente revelaram uma composição predominante, destacando as famílias Chthoniobacteraceae (22,4%), Sphingomonadaceae (21,2%), Geodermatophilaceae (12,1%) e SG8-39 (10,9%). Essas famílias representam parcelas significativas da comunidade microbiana presente no solo adjacente derivado de rocha ultramáfica, bem como das amostras de solo rizosféricos de ambas as espécies que salientam o recrutamento a partir de uma seleção do microbioma do solo.

Chthoniobacteraceae, uma família de bactérias pertencente ao filo Verrucomicrobiota, desempenha papéis essenciais na ciclagem de nutrientes e na decomposição de matéria orgânica complexa sendo formado por bactérias de vida livre que não formam esporos e são simbioses com nematoides, além disso são capazes de degradar moléculas de polissacarídeos complexas (JANSSEN; HEDLUND, 2015; KANT et al., 2011). Membros de Chthoniobacteraceae

também foram verificados nas amostras de solo rizosféricos de *J. lanstykii* e *L. lupulina*, porém com menores proporções de abundâncias quando comparado com o solo adjacente (22,4%), 20% e 14,3% respectivamente. Sphingomonadaceae é uma família de bactérias pertencentes ao filo Alphaproteobacteria que são conhecidas por sua versatilidade metabólica. Além disso, contribuem para a degradação de compostos orgânicos recalcitrantes, bem como tem seu papel na degradação de poluentes devido a sua plasticidade genômica para aquisição de genes via Transferência Horizontal de Genes (THG) (DAI et al., 2022).

Membros de Sphingomonadaceae foram verificados nas amostras de solo adjacente e na rizosfera de *J. lanstykii*, sugerindo uma provável contribuição adaptativa para o estabelecimento vegetal. Outra família verificada foi Geodermatophilaceae, uma família de Actinobacteriota. É um grupo recorrente em ambientes extremos, caracterizado como pioneiros biológicos uma vez que possuem mecanismos de resistência ao estresse ambiental como a formação de esporos que confere longevidade em períodos inoportunos, pigmentação de cor rosa a preta, composição da parede celular e alto conteúdo GC que pode as proteger de danos causados pela radiação UV alta (SUN et al., 2015). Ademais, outras famílias bacterianas foram identificadas, porém não possuem correspondência taxonômica predefinida com nenhuma família. Esses membros, possuem registros de fragmentos do seu gene 16S rRNA no banco de dados, mas são considerados como candidatos. A saber, foram classificadas em famílias os seguintes grupos: GS8-39, 70-9 e EWC2-71-9.

Chthoniobacteraceae demonstrou maior ocorrência na rizosfera de *J. lanstykii* e *L. lupulina*, além de correlações positivas com as famílias de bactéria Gaiellaceae, Mycobacteriaceae e outras duas famílias sem anotação taxonômica definida (CSP1_6 e 70_9). Outra família com alto grau de ligações na análise de network foi Geodermatophilaceae, porém essa família possui predominância de correlações negativas que estão ligadas a famílias derivadas do solo adjacente, tendo como única correlação positiva a ligação com Solirubrobacteraceae. Os membros centrais foram do solo adjacente dos quais a formação do microbioma rizosférico deriva e é composto por ligações com as famílias Bryobacteraceae, Ktedonobacteraceae, Enterobacteriaceae, SbA1 e 40CM_4_68_19. O microbioma de solos com altas concentrações de metais e/ou contaminantes possui membros centrais que estabelecem correlações com o rizobioma de espécies de plantas hiperacumuladoras de metais (HUANG et al., 2023).

Os membros do microbioma do solo adjacente, bem como da rizosfera, podem produzir metabólitos que interagem com os metais pesados presentes no solo. Yang et al. (2022) observaram que terpenos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e aminoácidos estavam

fortemente conectados com Acidobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Nitrospirae e alguns fungos não classificados. Terpenos e ácidos orgânicos podem complexar metais pesados formando ligantes quelantes ou quelatos solúveis em água, influenciando a mobilidade dos metais no solo (ASARE; SZÁKOVÁ; TLUSTOŠ, 2022; YANG et al., 2022). Compostos fenólicos, por sua vez, podem sorver ou adsorver formando complexos superficiais coloidais (KHANNA et al., 2019). Alguns ácidos orgânicos podem interagir com os metais pesados e promover a precipitação em formas químicas menos solúveis (LUO et al., 2024). Aminoácidos podem exercer o papel de redutores, influenciando a espécie química do metal, bem como podem modular a atividade microbiana (ASARE; SZÁKOVÁ; TLUSTOŠ, 2022; COMPANT et al., 2019).

A integração das técnicas de sequenciamento de última geração (NGS) neste estudo proporcionou uma visão aprofundada da dinâmica entre o solo, as plantas e seus microbiomas. Os resultados obtidos corroboram os achados anteriores, salientando que micro-organismos em ambientes contaminados podem impactar positivamente a produção de biomassa vegetal, destacando o potencial desses micro-organismos na biorremediação. Essa eficácia está intrinsecamente relacionada às diversas funções desempenhadas pelos micro-organismos do solo, incluindo a degradação, transformação e acumulação de contaminantes ambientais (CICATELLI et al., 2019). Além disso, a análise comparativa da diversidade bacteriana na rizosfera de plantas hiperacumuladoras de níquel sugere que fatores abióticos exercem uma influência mais significativa do que as próprias espécies vegetais na configuração dessa comunidade bacteriana (LOPEZ et al., 2020). Essas conclusões proporcionam uma base sólida para a compreensão das interações complexas no ambiente estudado e ressaltam a importância das abordagens integrativas para desvendar os intricados ecossistemas microbiológicos associados às plantas em solos específicos.

3.6 Conclusões

A rizosfera de *L. lupulina* demonstrou maior diversidade de micro-organismos em comparação com *J. lanstykii*. O solo adjacente exibiu os menores índices de diversidade. A rizosfera das espécies vegetais hiperacumuladoras de níquel demonstraram efeito de enriquecimento sobre as comunidades microbianas.

A estrutura das comunidades microbianas presentes na rizosfera das espécies vegetais possui clara distinção, exibindo agrupamentos por espécie vegetal e sendo distinta do solo adjacente. Os resultados do presente estudo comparando os microbiomas do solo derivado de rocha ultramáfica sem vegetação e os solos rizosféricos de *J. lanstykii* e *L. lupulina*, indicam que a modulação do rizobioma é resultado do recrutamento de parte do core microbiano do solo adjacente, além disso, a planta hospedeira influencia na diversidade, estrutura e composição. O microbioma associado a rizosfera das espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel estudadas exibiu notável enriquecimento e formação de uma rede interação mais complexa.

As famílias Ketodonobacteraceae e Sphingomonadaceae foram identificadas como biomarcadores do solo adjacente sem vegetação. As famílias Gaiellaceae, Geodermatophilaceae e Chthoniobacteraceae podem ser usadas como biomarcadores da rizosfera de *J. lanstykii*. Ketodonobacteraceae, SbA1 e Sphingomonadaceae podem ser usadas como biomarcadores da rizosfera de *L. lupulina*.

Os grupos identificados no compartimento rizosférico remontam bactérias anteriormente descritas como tolerantes, porém alguns membros sem identificação. Os principais e mais abundantes grupos microbianos identificados são responsáveis por papéis-chave na ciclagem de carbono e nitrogênio. Entretanto, foi verificada a ocorrência de bactérias ligadas a famílias auxiliares na atenuação do efeito dos metais pesados no solo, bem como membros microbianos capazes de promover o crescimento das plantas por meio da modulação metabólica vegetal. Os resultados sugerem seleção a partir dos táxons presentes no solo adjacente por meio dos exsudatos radiculares das espécies vegetais hiperacumuladoras de níquel que possam favorecer a disponibilidade de nutrientes ou que contribuam indiretamente via modulação hormonal ou antibiose.

Referências Bibliográficas

ANCOUSTURE, J.; DURAND, A.; BLAUDEZ, D.; BENIZRI, E. A reduced but stable core microbiome found in seeds of hyperaccumulators. **Science of The Total Environment**, v. 887, p. 164131, ago. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164131>.

ASARE, M. O.; SZÁKOVÁ, J.; TLUSTOŠ, P. The fate of secondary metabolites in plants growing on Cd-, As-, and Pb-contaminated soils—a comprehensive review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 5, p. 11378–11398, 19 dez. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24776-x>.

BAKER, A. J. M.; BROOKS, R. R. Terrestrial Higher Plants which Hyper-accumulate Metallic Elements - A Review of their Distribution, Ecology and Phytochemistry. 1989. .

BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. **Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media**, v. 3, n. 1, p. 361–362, 19 mar. 2009. <https://doi.org/10.1609/icwsm.v3i1.13937>.

BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T.; VERGÈS, M.-C. C.; CHARLES, T.; CHEN, X.; COCOLIN, L.; EVERSOLE, K.; CORRAL, G. H.; KAZOU, M.; KINKEL, L.; LANGE, L.; LIMA, N.; LOY, A.; MACKLIN, J. A.; MAGUIN, E.; MAUHLIN, T.; MCCLURE, R.; ... SCHLOTTER, M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 103, dez. 2020. DOI 10.1186/s40168-020-00875-0. Disponível em: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00875-0>. Acesso em: 3 maio 2023.

BOUBEKRI, K.; SOUMARE, A.; MARDAD, I.; LYAMLOULI, K.; OUHDOUCH, Y.; HAFIDI, M.; KOUISNI, L. Multifunctional role of Actinobacteria in agricultural production sustainability: A review. **Microbiological Research**, v. 261, p. 127059, ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127059>.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, abr. 2013. DOI 10.1146/annurev-arplant-050312-120106. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>. Acesso em: 9 maio 2023.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; ... KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, ago. 2012. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.

CARDOSO, P. H.; CABRAL, A.; SANTOS-SILVA, F.; SALIMENA, F. R. G. Verbenaceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 71, p. e03072018, 2020. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071032>.

CICATELLI, A.; FERROL, N.; ROZPADEK, P.; CASTIGLIONE, S. Editorial: Effects of Plant-Microbiome Interactions on Phyto- and Bio-Remediation Capacity. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 533, 26 abr. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00533>.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, Amsterdam, v. 19, p. 29–37, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>.

DAI, H.; GAO, J.; LI, D.; WANG, Z.; CUI, Y.; ZHAO, Y. Family Sphingomonadaceae as the key executor of triclosan degradation in both nitrification and denitrification systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 442, p. 136202, ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136202>.

DARZI, Y.; LETUNIC, I.; BORK, P.; YAMADA, T. iPath3.0: interactive pathways explorer v3. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W510–W513, 2 jul. 2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gky299>.

DE ANDRADE, L. R. M.; DE GÓIS AQUINO, F.; REIS, F. B. Potencial de uso de espécies vegetais nativas dos Complexos Ultramáficos de Barro Alto (GO) nos processos de recuperação de áreas alteradas pela extração de Ni, de fitoextração e fitominação de metais. *In: XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO*, 2015. [S. l.: s. n.], 2015. p. np.

DEMENOIS, J.; MERINO-MARTÍN, L.; FERNANDEZ NUÑEZ, N.; STOKES, A.; CARRICONDE, F. Do diversity of plants, soil fungi and bacteria influence aggregate stability on ultramafic Ferralsols? A metagenomic approach in a tropical hotspot of biodiversity. **Plant and Soil**, v. 448, n. 1–2, p. 213–229, mar. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04364-8>.

DOUGLAS, G. M.; MAFFEI, V. J.; ZANEVELD, J. R.; YURGEL, S. N.; BROWN, J. R.; TAYLOR, C. M.; HUTTENHOWER, C.; LANGILLE, M. G. I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 685–688, jun. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>.

FUERST, J. A. Phylum Verrucomicrobia. **Reference Module in Life Sciences**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. B9780128096338207723. DOI 10.1016/B978-0-12-809633-8.20772-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338207723>. Acesso em: 5 jan. 2024.

FUNARI, C. S.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; MARTINEZ, I.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; SILVA, D. H. S.; GRAMINHA, M. A. S. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong in vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity. v. 46, dez. 2016. .

HAAKE, D. A. Spirochetes. **Encyclopedia of Microbiology**. [S. l.]: Elsevier, 2009. p. 278–292. DOI 10.1016/B978-012373944-5.00230-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739445002303>. Acesso em: 8 jan. 2024.

HOOVER, R. B.; PIKUTA, E. V.; BEJ, A. K.; MARSIC, D.; WHITMAN, W. B.; TANG, J.; KRADER, P. *Spirochaeta americana* sp. nov., a new haloalkaliphilic, obligately anaerobic spirochaete isolated from soda Mono Lake in California. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 815–821, 1 maio 2003. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02535-0>.

HUANG, Y.; HUANG, Y.; HOU, J.; WU, L.; CHRISTIE, P.; LIU, W. Microbial community assembly of the hyperaccumulator plant *Sedum plumbizincicola* in two contrasting soil types with three levels of cadmium contamination. **Science of The Total Environment**, v. 863, p. 160917, mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160917>.

IGWE, A. N.; VANNETTE, R. L. Bacterial communities differ between plant species and soil type, and differentially influence seedling establishment on serpentine soils. **Plant and Soil**, v. 441, n. 1–2, p. 423–437, ago. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04135-5>.

INMET. INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. 2023. **Estações meteorológicas**. Disponível em: <https://mapas.inmet.gov.br/#>. Acesso em: 8 nov. 2023.

JANSSEN, P. H.; HEDLUND, B. P. *Chthoniobacteraceae* fam. nov. In: WHITMAN, W. B. (org.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2015. p. 1–1. DOI 10.1002/9781118960608.fbm00256. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.fbm00256>. Acesso em: 10 jan. 2024.

KANT, R.; VAN PASSEL, M. W. J.; PALVA, A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; GLAVINA DEL RIO, T.; DALIN, E.; TICE, H.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; LARIMER, F. W.; LAND, M. L.; HAUSER, L.; SANGWAN, P.; DE VOS, W. M.; JANSSEN, P. H.; SMIDT, H. Genome Sequence of *Chthoniobacter flavus* Ellin428, an Aerobic Heterotrophic Soil Bacterium. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 11, p. 2902–2903, jun. 2011. <https://doi.org/10.1128/JB.00295-11>.

KHANNA; KOHLI; OHRI; BHARDWAJ; AL-HUQAIL; SIDDIQUI; ALOSAIMI; AHMAD. Microbial Fortification Improved Photosynthetic Efficiency and Secondary Metabolism in *Lycopersicon esculentum* Plants Under Cd Stress. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 581, 7 out. 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9100581>.

KHILYAS, I. V.; SOROKINA, A. V.; ELISTRATOVA, A. A.; MARKELOVA, M. I.; SINIAGINA, M. N.; SHARIPOVA, M. R.; SHCHERBAKOVA, T. A.; D'ERRICO, M. E.; COHEN, M. F. Microbial diversity and mineral composition of weathered serpentine rock of the Khalilovsky massif. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0225929, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225929>.

LANGILLE, M. G. I.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J. A.; CLEMENTE, J. C.; BURKEPILE, D. E.; VEGA THURBER, R. L.; KNIGHT, R.; BEIKO, R. G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814–821, set. 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>.

LEE, S.-H.; PARK, J.-H.; KANG, H.-J.; LEE, Y. H.; LEE, T. J.; PARK, H.-D. Distribution and abundance of Spirochaetes in full-scale anaerobic digesters. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 25–32, out. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.070>.

LIMA, M. R.; GOMES, H. T.; CURY, N. F.; PEREIRA, L. A. R.; DOS SANTOS SILVEIRA, C. E. Developing propagation protocols for *Justicia lanstyakii* Rizz. (Acanthaceae), an ornamental Ni-accumulating subshrub of Brazilian Cerrado. **Biologia**, v. 77, n. 4, p. 967–980, abr. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00987-4>.

LOPEZ, S.; VAN DER ENT, A.; SUMAIL, S.; SUGAU, J. B.; BUANG, M. M.; AMIN, Z.; ECHEVARRIA, G.; MOREL, J. L.; BENIZRI, E. Bacterial community diversity in the rhizosphere of nickel hyperaccumulator plant species from Borneo Island (Malaysia). **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1649–1665, abr. 2020. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14970>.

LU, Y.; ZHOU, G.; EWALD, J.; PANG, Z.; SHIRI, T.; XIA, J. MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W310–W318, 5 jul. 2023. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad407>.

LUO, Y.; HE, Y.; ZHOU, D.; PAN, L.; WU, Y. Organic amendment application affects the release behaviour, bioavailability, and speciation of heavy metals in zinc smelting slag: Insight into dissolved organic matter. **Journal of Hazardous Materials**, v. 465, p. 133105, mar. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133105>.

MARTOS, S.; BUSOMS, S.; PÉREZ-MARTÍN, L.; LLUGANY, M.; CABOT, C.; POSCHENRIEDER, C. Identifying the Specific Root Microbiome of the Hyperaccumulator *Noccaea brachypetala* Growing in Non-metalliferous Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 639997, maio 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.639997>.

MCDONALD, D.; PRICE, M. N.; GOODRICH, J.; NAWROCKI, E. P.; DESANTIS, T. Z.; PROBST, A.; ANDERSEN, G. L.; KNIGHT, R.; HUGENHOLTZ, P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 610–618, mar. 2012. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

MENDONÇA, R. de; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA-JÚNIOR, M. da; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. de S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. **Cerrado: ecologia e flora**, v. 2, p. 423–1279, 2008. .

NASCIMENTO, C. W. A. D.; LIMA, L. H. V.; SILVA, Y. J. A. B. D.; BIONDI, C. M. Ultramafic soils and nickel phytomining opportunities: A review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 46, p. e0210099, abr. 2022. <https://doi.org/10.36783/18069657rbc20210099>.

POLLARD, K. S.; DUDOIT, S.; VAN DER LAAN, M. J. Multiple Testing Procedures: the multtest Package and Applications to Genomics. *In*: GENTLEMAN, R.; CAREY, V. J.; HUBER, W.; IRIZARRY, R. A.; DUDOIT, S. (orgs.). **Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor**. Statistics for Biology and Health. New York, NY: Springer New York, 2005. p. 249–271. DOI 10.1007/0-387-29362-0_15. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/0-387-29362-0_15. Acesso em: 22 jan. 2024.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, nov. 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M.; BECQUER, T.; ECHEVARRIA, G.; MIRANDA, Z. J. G. The flora and biogeochemistry of the ultramafic soils of Goiás state, Brazil. **Plant and Soil**, v. 293, n. 1–2, p. 107–119, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9192-x>.

RIBEIRO, I. D. A.; VOLPIANO, C. G.; VARGAS, L. K.; GRANADA, C. E.; LISBOA, B. B.; PASSAGLIA, L. M. P. Use of Mineral Weathering Bacteria to Enhance Nutrient Availability in Crops: A Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 590774, dez. 2020. DOI 10.3389/fpls.2020.590774. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.590774/full>. Acesso em: 18 maio 2023.

ROLIM, G. de S.; CAMARGO, M. B. P. de; LANIA, D. G.; MORAES, J. F. L. de. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 711–720, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052007000400022>.

SENTHIL KUMAR, R.; KONER, S.; TSAI, H.-C.; CHEN, J.-S.; HUANG, S.-W.; HSU, B.-M. Deciphering endemic rhizosphere microbiome community's structure towards the host-derived heavy metals tolerance and plant growth promotion functions in serpentine geoecosystem. **Journal of Hazardous Materials**, v. 452, p. 131359, jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131359>.

SUN, H.-M.; ZHANG, T.; YU, L.-Y.; SEN, K.; ZHANG, Y.-Q. Ubiquity, diversity and physiological characteristics of Geodermatophilaceae in Shapotou National Desert Ecological Reserve. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 30 set. 2015. DOI 10.3389/fmicb.2015.01059. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01059/abstract>. Acesso em: 12 jan. 2024.

THIEL, V.; FUKUSHIMA, S.-I.; KANNO, N.; HANADA, S. Chloroflexi. **Reference Module in Life Sciences**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. B9780128096338207711. DOI 10.1016/B978-0-12-809633-8.20771-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338207711>. Acesso em: 4 jan. 2024.

VIEIRA LIMA, L. H. **Agromineração no Brasil: busca por hiperacumuladoras tropicais, estratégias de manejo e riscos ecossistêmicos por exposição a solos ultramáficos**. 2023. 149 f. Tese – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2023. Disponível em: <https://www.pgs.ufrpe.br/sites/default/files/testes-dissertacoes/LUIZ%20HENRIQUE%20VIEIRA%20LIMA.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2023.

VOLANT, S.; LECHAT, P.; WORINGER, P.; MOTREFF, L.; CAMPAGNE, P.; MALABAT, C.; KENNEDY, S.; GHOZLANE, A. SHAMAN: a user-friendly website for metataxonomic analysis from raw reads to statistical analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 345, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03666-4>.

WHIPPS, J.; LEWIS, K.; COOKE, R. Mycoparasitism and plant disease control. **Fungi Biology Control**. Manchester University Press. Manchester: Burge M, 1988. p. 161–187. . Acesso em: 8 maio 2023.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer. Verlag New York: [s. n.], 2016.

WICKHAM, H. Reshaping Data with the **reshape** Package. **Journal of Statistical Software**, v. 21, n. 12, 2007. DOI 10.18637/jss.v021.i12. Disponível em: <http://www.jstatsoft.org/v21/i12/>. Acesso em: 14 mar. 2024.

WICKHAM, H.; FRANCOIS, R. **dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R Package Version 0.4.3**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.

WU, Y.; SANTOS, S. S.; VESTERGÅRD, M.; MARTÍN GONZÁLEZ, A. M.; MA, L.; FENG, Y.; YANG, X. A field study reveals links between hyperaccumulating Sedum plants-associated bacterial communities and Cd/Zn uptake and translocation. **Science of The Total Environment**, v. 805, p. 150400, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150400>.

XU, S.; ZHAN, L.; TANG, W.; WANG, Q.; DAI, Z.; ZHOU, L.; FENG, T.; CHEN, M.; WU, T.; HU, E.; YU, G. MicrobiotaProcess: A comprehensive R package for deep mining microbiome. **The Innovation**, v. 4, n. 2, p. 100388, mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100388>.

YANG, C.; HAN, N.; INOUE, C.; YANG, Y.-L.; NOJIRI, H.; HO, Y.-N.; CHIEN, M.-F. Rhizospheric plant-microbe synergistic interactions achieve efficient arsenic phytoextraction by *Pteris vittata*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 434, p. 128870, jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128870>.

ZHANG, G.; SHI, L.; LIU, C.; HUANG, Z.; ZHENG, Y.; DONG, L. Rhizosphere effects on the microbial community: Specificity and conservatism across geographically disjunct *Panax* species. **Applied Soil Ecology**, v. 192, p. 105075, dez. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105075>.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi realizada a análise do microbioma dos solos rizosféricos das plantas hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia e comparado com a composição microbiana do solo adjacente à rizosfera.

A nível de filo, os solos rizosféricos das espécies hiperacumuladoras de níquel endêmicas da Niquelândia demonstraram filós como: Actinobacteriota, Acidobacteriota, Verrucomicrobia, Chloroflexota, Proteobacteria, Gemmatimonadota e Planctomycetota.

A modulação do rizobioma é uma interação complexa entre a planta hospedeira e o core microbiano do solo.

Este estudo destacou não apenas a diversidade e a estrutura desses microbiomas, mas também ressaltou o enriquecimento notável e a formação de redes mais complexas no nicho rizosférico.

Ao avançar na pesquisa, reconhecemos a existência de desafios metodológicos, principalmente na identificação de alguns membros microbianos sem classificação específica.

Este estudo abre portas para pesquisas futuras que podem se aprofundar nas interações específicas entre os exsudatos radiculares das plantas hiperacumuladoras e os táxons presentes no solo adjacente.

Sugerimos que investigações futuras empreguem abordagens ômicas mais avançadas, como metagenômica, metaproteômica e metranscriptômica, para obter uma compreensão mais completa do microbioma, bem como o detalhamento dessas interações. Além disso, sugere-se explorar os potenciais genes envolvidos na hiperacumulação de níquel em pesquisas subsequentes.

Após a remoção das posições iniciais e terminais com baixa qualidade (quality score), observa-se que o sequenciamento atingiu uma excelente qualidade de sequências e com baixas perdas de *reads* após a etapa de trimagem (Tabela 7). As sequências filtradas atingiram Phred score acima da média em relação as sequências brutas (acima de 33) com tamanho de fragmento mantendo-se próximo de 150 pb. Tais informações e resultados são relevantes para as etapas posteriores de anotação e contagem que são dependentes de que a qualidade pós-processamento das sequências sejam de boas o suficiente e mantenham o seu tamanho de fragmento.

Figura 17. Agrupamento gráfico da qualidade das sequências *forward* obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.

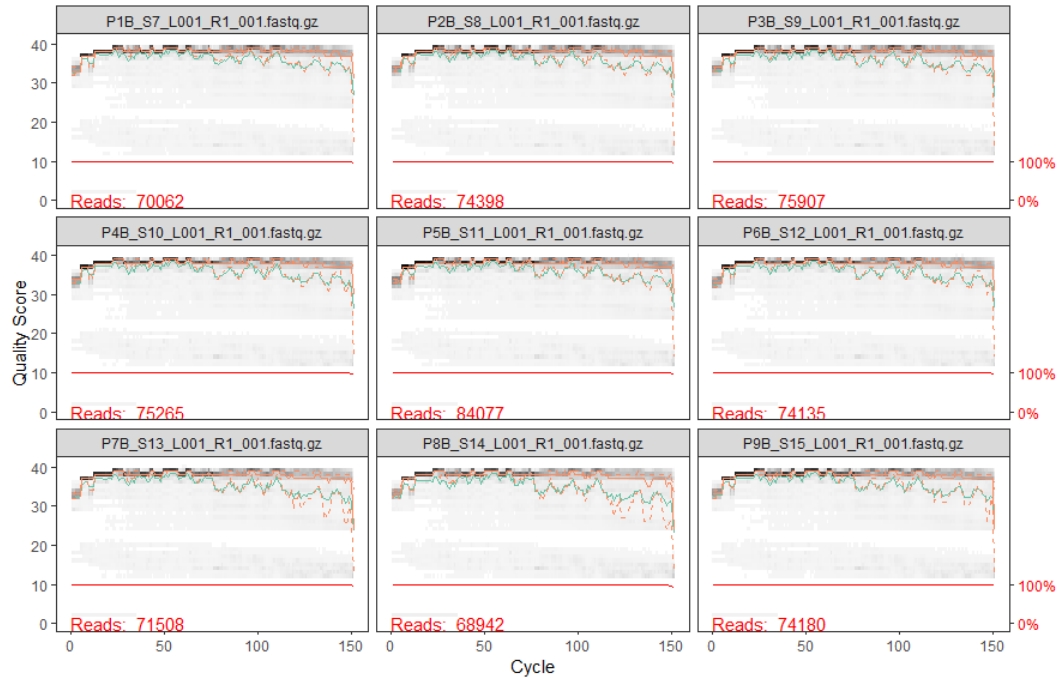


Figura 18. Agrupamento gráfico da qualidade das sequências *reverse* obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.

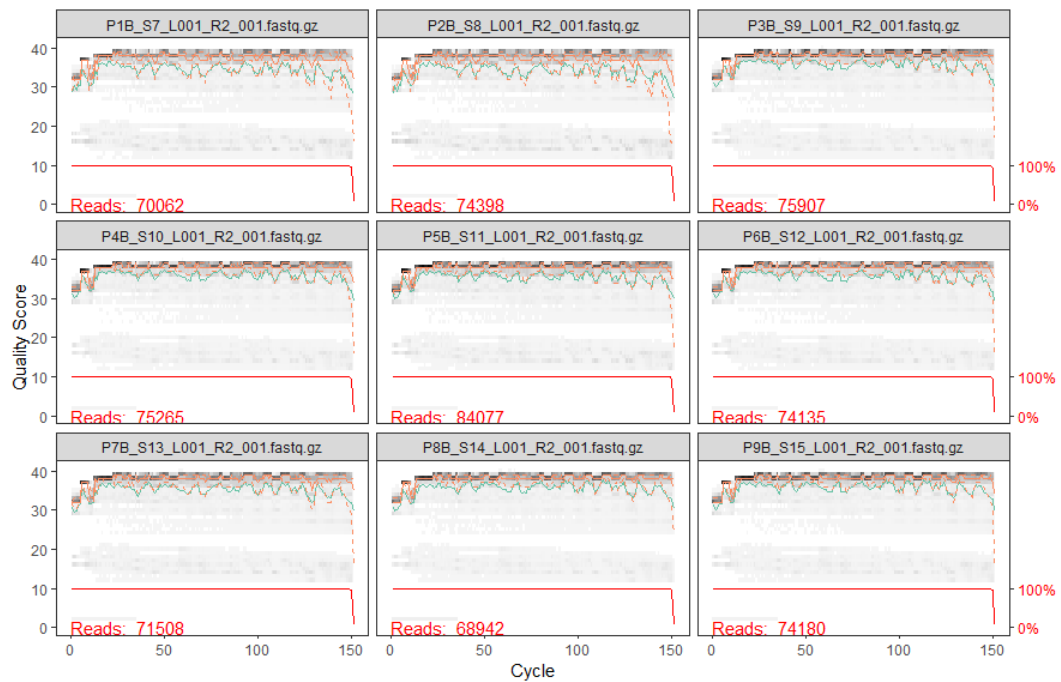


Figura 19. Agrupamento gráfico da qualidade das sequências *forward* obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq após o procedimento de trimagem para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia.

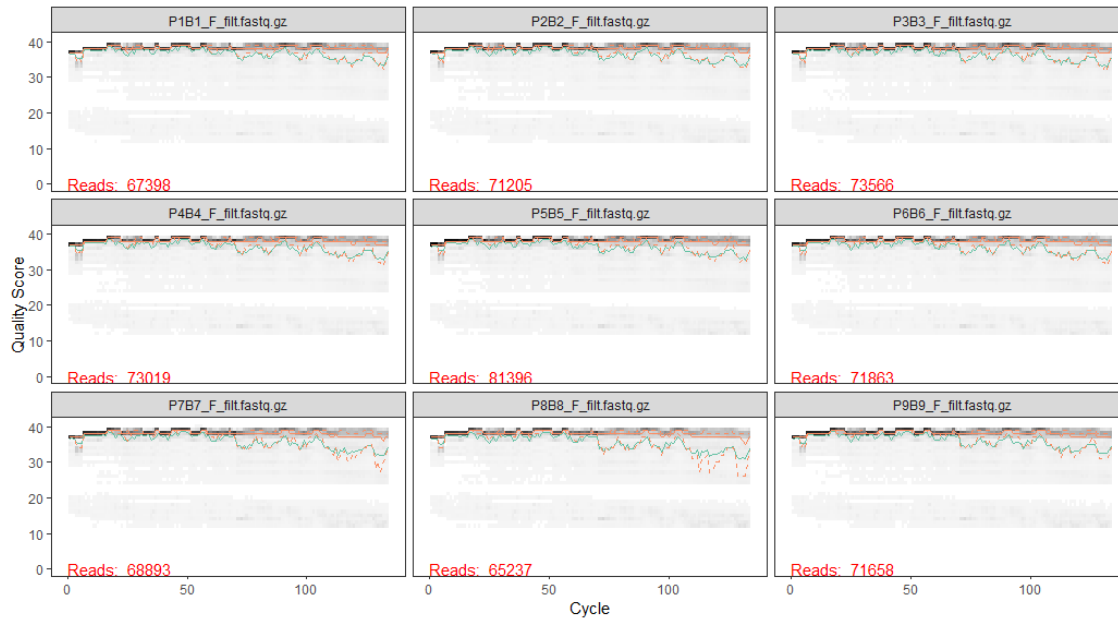
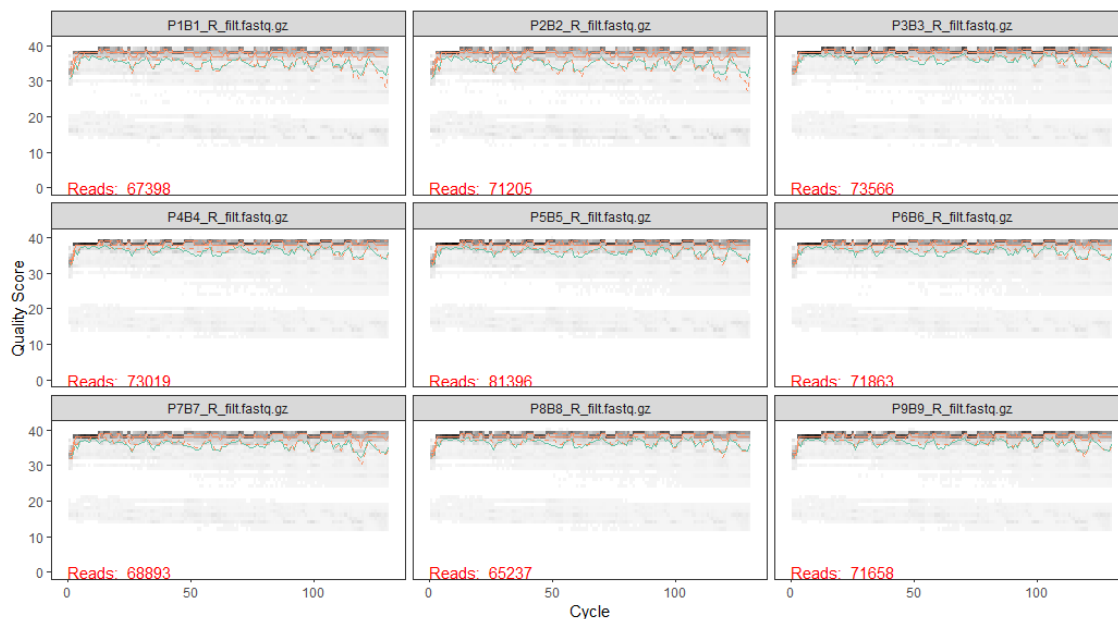


Figura 20. Agrupamento gráfico da qualidade das sequências *reverse* obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq após o procedimento de trimagem para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia.



Após o procedimento de trimagem (remoção de posições com baixa qualidade de amplificação), é possível observar as taxas de erros de frequência por um score de qualidade consenso a partir dos pares de cara um dos quatro nucleotídeos que foram gerados a partir das sequências forward e reverse (Figuras 21 e 22).

Figura 21. Taxas de erro transicionais observadas e estimadas para as sequências forward obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq após o procedimento de trimagem para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia.

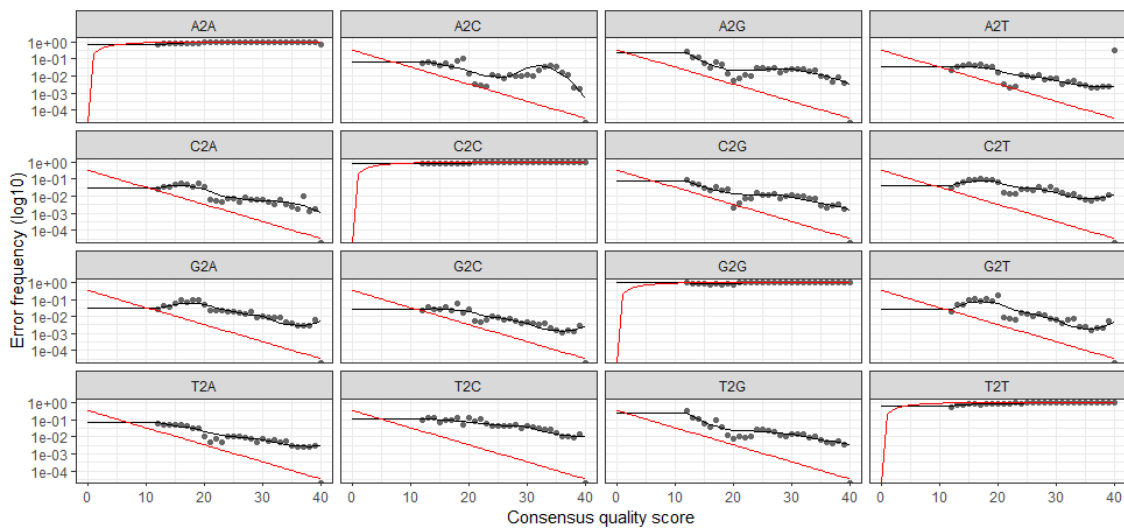
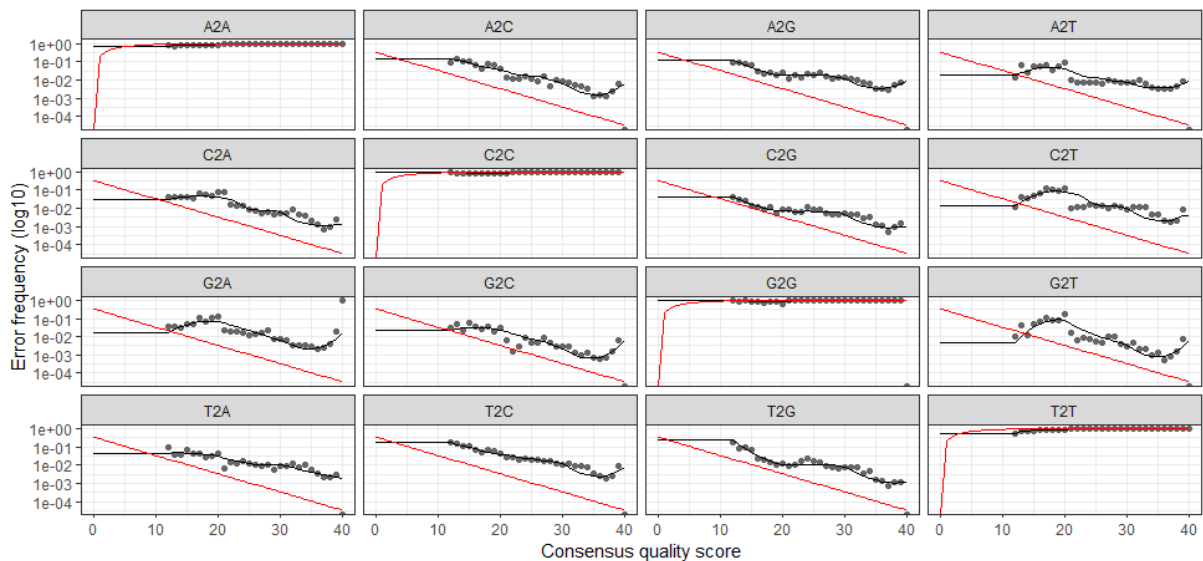


Figura 22. Taxas de erro transicionais observadas e estimadas para as sequências reverse obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq após o procedimento de trimagem para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia.



No gráfico, cada ponto preto representa as taxas de erros observadas em relação à pontuação de qualidade de consenso (Consensus Quality Score). A linha preta, que representa as taxas de erro estimadas pelo algoritmo de aprendizado de máquina, demonstra como o sistema se ajusta para minimizar erros após analisar muitas sequências. A linha vermelha, por outro lado, é uma referência que mostra como as taxas de erro deveriam ser idealmente, de acordo com o Q-score.

Neste caso, as taxas de erro que o algoritmo estimou (linha preta) se alinham bem com as taxas de erro que realmente foram observadas (pontos). Além disso, à medida que a qualidade das sequências aumenta, as taxas de erro diminuem, como esperado. Isso é um sinal positivo, indicando que o algoritmo está funcionando bem e que as sequências de alta qualidade foram identificadas corretamente.

O número médio de sequências combinadas ausentes de quimeras utilizando o pacote DADA2 no ambiente R foi de 72. A amostra P7B (RS_LL1) alcançou a maior profundidade de informações com 199 agrupamentos, seguido pela amostra P5B (RS_JL2) com 100 agrupamentos. O valor mínimo de sequências combinadas ausentes de quimeras foi de 25. A perda média de informações do conjunto de dados utilizando a abordagem de agrupamento por ASVs foi de 99,89% (Tabela 8).

Tabela 8. Descrição do processamento dos dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA por etapas do procedimento de análise de acordo com a ferramenta bioinformática utilizada para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.

DADA2						
ID Seq	Entrada	Filtradas	Denoised F	Denoised R	Merged	NoChim
P1B	70062	67398	64022	65676	36	36
P2B	74398	71205	67986	69297	25	25
P3B	75907	73566	67830	71452	42	41
P4B	75265	73019	69370	70836	88	88
P5B	84077	81396	77614	79192	100	100
P6B	74135	71863	68275	69962	64	64
P7B	71508	68893	66909	67566	200	199
P8B	68942	64237	62559	63858	60	59
P9B	74180	71658	69504	70169	44	39
SHAMAN						
ID Seq	Entrada	Filtradas	Denoised F	Denoised R	Merged	NoChim
P1B	70062	65849	65842	65842	64215	64213
P2B	74398	69390	69386	69386	67702	67700
P3B	75907	72828	72813	72813	71007	71000
P4B	75265	72354	72335	72335	70606	70597
P5B	84077	80424	80399	80399	78411	78404
P6B	74135	71376	71364	71364	69511	69505
P7B	71508	68116	68100	68100	66673	66672
P8B	68942	65014	65000	65000	63571	63566
P9B	74180	71199	71179	71179	69703	69693

As observações resultantes do agrupamento por OTUs demonstraram menores perdas em termos de profundidade de informações. O número médio de *reads* de entrada foi de 74275, das quais após as etapas de processamento apenas 7% dos dados foram removidos por baixa qualidade, resultado em um número médio de sequências agrupadas ausentes de quimeras de 69039.

Diante dos resultados obtidos após a etapa de processamento das sequências, a melhor abordagem para anotação taxonômica seria o agrupamento por OTUs. A inferência da análise por ASVs demonstrou significativa perda de profundidade de informações. Dessa forma, proceder a análise com tal abordagem subestimaria a composição do microbioma nos ambientes de estudo do presente trabalho. Observando a curva de rarefação na Figura 23, percebe-se que grande parte das amostras não atingiu o platô, indicando que possivelmente mais amostras seriam necessárias para configurar a abordagem por ASVs como a melhor inferência. Observando a Figura 24 e 25, percebe-se a melhoria na curva de rarefação mediante a análise por OTUs.

Figura 23. Curva de rarefação usando a abordagem por ASVs avaliada por espécies e tamanho de amostral obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.

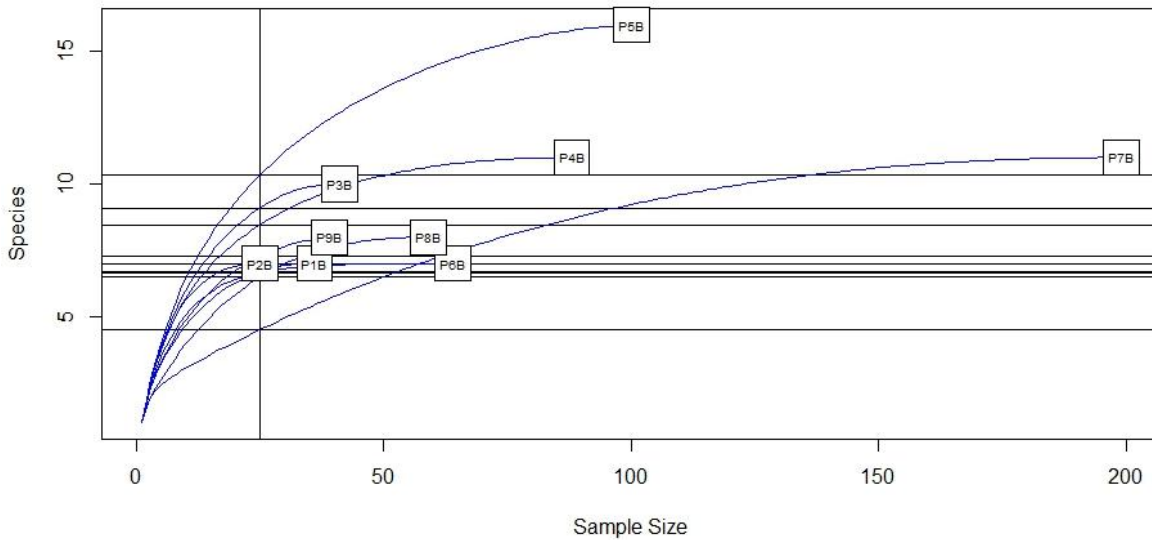


Figura 24. Curva de rarefação usando a abordagem por OTUs avaliada por família e tamanho de amostral obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento Illumina Mi-Seq para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii* endêmicas da Niquelândia.

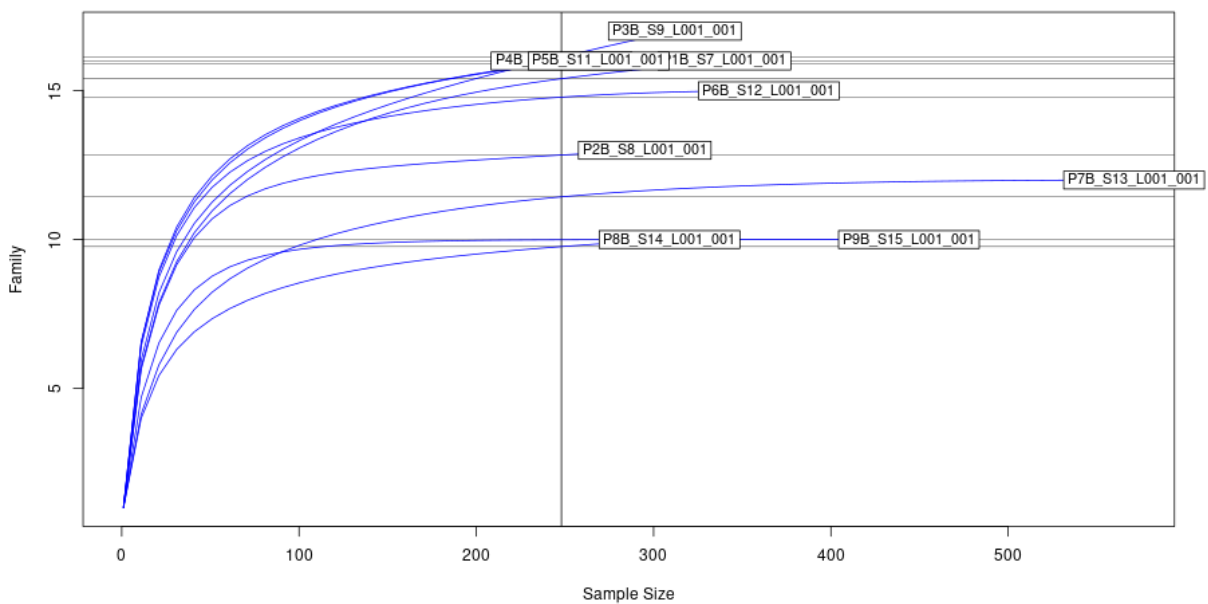


Figura 25. Curvas de rarefação das amostras visualizadas de acordo com a diversidade observada, índice Chao1 e ACE dos dados de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA por etapas do procedimento de análise de acordo com a ferramenta bioinformática utilizada

para as amostras de solo associadas a rizosfera das espécies de hiperacumuladoras de níquel *Lippia lupulina* e *Justicia lanstykii* endêmicas da Niquelândia.

