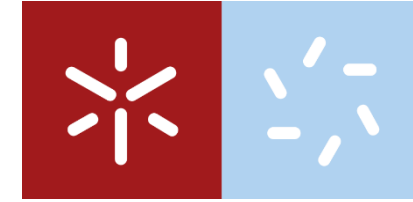




Avaliação da resposta da comunidade microbiana de solos à aplicação de um biocida (EucaBio)

Carla Flores

UMinho | 2024



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Carla Filipa Amorim Flores

Avaliação da resposta da comunidade microbiana de solos à aplicação de um biocida (EucaBio)

Março de 2024



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Carla Filipa Amorim Flores

**Avaliação da resposta da comunidade
microbiana de solos à aplicação de um
biocida (EucaBio)**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Biologia Molecular, Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação da
**Professora Doutora Teresa Lino Neto
e Doutora Daniela Costa**

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Com a finalização deste trabalho, não poderia deixar de referir o meu enorme agradecimento a todos aqueles que contribuíram para o meu percurso, não só a nível académico mas também pessoal, ao longo deste tempo.

As minhas orientadoras, a Professora Doutora Teresa Lino Neto e Doutora Daniela Costa, um enorme obrigada pelo acompanhamento, por toda a disponibilidade e, principalmente, pela paciência. Obrigada por todo o apoio e força para a conclusão desta etapa, não seria possível sem vocês. Um agradecimento os meus colegas de laboratório que todos os dias estavam presentes para ajudar em todos os aspetos relacionados com este trabalho.

As amigas que a universidade me deu, Catarina e Joana, um abraço muito apertado. Obrigada por me ouvirem, por deixarem-me repetir mil conversas sobre este trabalho e mais importante por me apoiarem sempre de forma incondicional.

A ela, Sara, o maior dos agradecimentos por todo carinho, cuidado, paciência e principalmente pelo incentivo para a conclusão deste projeto. Obrigada por aturares todos os meus momentos de pânico e ansiedade, por estares sempre presente e por acreditares sempre em mim, mesmo quando eu não conseguia fazer o mesmo.

E por último, quero agradecer aos meus pais e a minha irmã pelo apoio incondicional para a realização desta etapa tão importante da minha vida.

Muito obrigada a todos!

Este trabalho contou com o apoio de fundos nacionais atribuídos pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do projeto PCIF/GVB/0150/2018 (PEST(bio)CIDE) e pelo programa estratégico ao CBMA (UIDB/04050/2020).



DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

Avaliação da resposta da comunidade microbiana de solos à aplicação de um biocida (EucaBio)

Eucalyptus globulus é uma espécie invasora, que se encontra amplamente difundida nas florestas portuguesas. Apesar da enorme importância da substituição do eucalipto por espécies nativas, existem diversos fatores económicos, sociais e políticos que dificultam a sua implementação. Por esta razão, são necessárias soluções alternativas para reduzir a expansão espontânea da área de eucalipto em Portugal. As folhas de eucalipto têm potencial fitotóxico e o seu uso como herbicida sustentável pode ajudar a reduzir a biomassa de eucalipto presente nas florestas. Neste trabalho foi realizada a avaliação do impacto nas comunidades microbianas de solos agrícolas do EucaBio_sólido, um herbicida ecológico, por sequenciação de alto rendimento (*Illumina*). Este trabalho contribui para a validação do EucaBio_sólido como uma alternativa aos herbicidas sintéticos. A comunidade microbiana presente nas amostras de solo com diferentes concentrações de EucaBio_sólido (0 %, 2,5 %, 5 % e 10 %) e em três tempos diferentes (T0, T1 e T2) foi avaliada por *metabarcoding* da região *16S* e *ITS* do *rRNA*. Foram identificados 14.914 *amplicon sequence variants* bacterianos e 5.607 *amplicon sequence variants* fúngicos, onde os filos com maior abundância foram *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Acidobacteria* para a comunidade bacteriana, e os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* para a comunidade fúngica. De entre todas as amostras, o controlo revelou ter uma comunidade microbiana mais rica e diversa, principalmente na comunidade bacteriana, enquanto que a concentração de 10 % foi a que apresentou menor riqueza e diversidade microbiana, mostrando assim, um maior impacto na comunidade. A concentração de EucaBio_sólido foi o fator mais significativo na variabilidade da composição das comunidades das diferentes amostras. Assim, este trabalho permitiu identificar os grupos taxonómicos com maiores alterações devido à aplicação do bio-herbicida EucaBio. Este impacto foi tanto maior quanto mais alta a concentração de EucaBio_sólido, o que evidencia que a aplicação deve ser realizada a concentrações mais baixas.

Palavras-chave: *Eucalyptus globulus*; EucaBio; Comunidade fúngica e bacteriana

Abstract

Assessment of the response of the soil microbial community to the application of a biocide (EucaBio)

Eucalyptus globulus is an invasive species, widely distributed in Portuguese forests. Although there is a great importance on the replacement of eucalyptus with native plant species, the existence of several economic, social, and political factors difficult its implementation. For this reason, alternative solutions to reduce the spontaneous expansion of eucalyptus area in Portugal are needed. Eucalyptus leaves have phytotoxic potential and their use as an environmentally friendly herbicide could help reduce the eucalypt biomass in forests. In this work, the assessment of the impact of EucaBio_solid (eco-friendly herbicide) application on microbial communities of agricultural soil was performed by high-throughput sequencing (*Illumina*). This work contributes to validate EucaBio_solid as a sustainable alternative to synthetic herbicides. The soil microbial community was assessed using different concentrations of EucaBio_solid (0 %, 2.5 %, 5 % and 10 %) and three collection times (T0, T1 and T2) using metabarcoding of *16S* and *ITS* rRNA regions. Overall, 14,914 bacterial amplicon sequence variants and 5,607 fungal amplicon sequence variants were identified, with a high abundance of the phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Acidobacteria* in the bacterial community, and Ascomycota and Basidiomycota in the fungal community. Microbial communities from control samples revealed a higher richness and abundance, mainly in the bacterial community, while microbial communities in the 10 % samples displayed the lowest. EucaBio_solid concentration was the most significant factor for the variability of microbial community's composition. This work allowed the identification of taxonomic groups that are most affected by the bioherbicide application. This impact is greater in the highest concentration of EucaBio_solid, being advisable to perform the application in a lower concentration.

Keywords: *Eucalyptus globulus*; EucaBio; Fungal and bacterial community

Índice Geral

Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Lista de abreviações	x
1. Introdução	1
1.1. O eucalipto-comum	2
1.2. Eucalipto e os incêndios	3
1.3. Eucalipto e os compostos aleloquímicos	5
1.4. Herbicidas sintéticos e as novas perspectivas	6
1.5. Microrganismos presentes no solo	8
1.6. Objetivos da tese	11
2. Material e Métodos	12
2.1. EucaBio_sólido	12
2.1.1. Efeito do EucaBio_sólido em ensaios em vaso	13
2.1.2. Extração de DNA	13
2.1.3. Preparação e sequenciação das amostras de solos	14
2.1.4. Análise de sequências usando ferramentas de bioinformática	16
2.1.5. Análise de dados	17
3. Resultados e discussão	18
3.1. Extração e amplificação de DNA	18
3.2. Sequenciação e controlo de qualidade	19
3.3. Comunidades microbianas no solo: diversidade e composição	19
3.3.1. Comunidade bacteriana	19
3.3.2. Comunidade fúngica	26
3.3.3. Comparação das comunidades bactérias e fúngicas	31
4. Conclusão	33
5. Referências	33
6. Anexos	45

Índice de Figuras

Figura 1: Principais espécies florestais presentes no território continental português e correspondente percentagem de área que ocupam no mesmo território (ICNF, 2019).	1
Figura 2: Representação das diversas fito-hormonas produzidas por PGPR e as alterações que estas podem induzir no desenvolvimento de plantas (Khatoon <i>et al.</i> , 2020).	9
Figura 3: Metodologia experimental utilizada para a elaboração deste trabalho. Folhas jovens de eucalipto foram desidratadas e posteriormente incorporadas em solo agrícola a diferentes concentrações, foram realizadas recolhas de amostras de solo em 3 tempos diferentes (com intervalos de 2 semanas) e, posteriormente, realizou-se a extração de DNA com a utilização de kits apropriados, sequenciação por <i>Illumina</i> e análise dos dados com recurso a ferramentas bioinformáticas.	12
Figura 4: Primers usados para amplificar a região <i>ITS2</i> do barcode fúngico. <i>ITS3</i> : <i>Primer forward</i> ; <i>ITS4</i> : <i>Primer reverse</i> ; <i>5.8S rDNA</i> ; <i>ITS2</i> : <i>Internal transcribed spacer 2</i> ; <i>28S rDNA</i> : <i>28S nuclear ribosomal large subunit</i>	14
Figura 5: Detecção representativa de fragmentos amplificados das regiões <i>ITS</i> das amostras de solo com diferentes concentrações de <i>EucaBio_sólido</i> , através de eletroforese em gel de agarose (1,5 %, p/v). Para a amplificação foram utilizados os primers universais <i>ITS3</i> e <i>ITS4</i> . As referências de 1 a 29 referem a amplificação de DNA fúngico das amostras de solos, discriminadas à direita. C- : controlo negativo; MM: Marcador Molecular 100 bp.	18
Figura 6: Curvas de rarefação da comunidade bacteriana obtidas por sequenciação da região <i>16S</i> do <i>rRNA</i> presente nas amostras de solo com diferentes concentrações de <i>EucaBio_sólido</i>	20
Figura 7: Diversidade da comunidade bacteriana encontrada nas amostras de solos. <i>S</i> : riqueza microbiana, <i>I-D</i> : índice de Gini-Simpson e <i>H'</i> : índice de Shannon. Diferentes letras significam diferenças estatisticamente significativas, onde as letras maiúsculas (A-D) se referem à diferença entre concentrações de <i>EucaBio_sólido</i> e as minúsculas (a-c) entre os tempos de aplicação de cada concentração (Anexo 2).	21
Figura 8: Riqueza das bactérias isoladas do solo agrícola com incorporação de <i>EucaBio_sólido</i> , considerando todas as amostras. Gráfico criado em Krona (Ondov <i>et al.</i> , 2011).	22
Figura 9: Abundância relativa das bactérias isoladas do solo agrícola com incorporação de <i>EucaBio_sólido</i> , considerando todas as amostras. Gráfico criado em Krona (Ondov <i>et al.</i> , 2011).	23
Figura 10: Abundâncias relativas dos filos bacterianos (A) e das principais famílias bacterianas (B) reveladas pela sequenciação do amplicão <i>16S</i> das amostras de solo em diferentes condições. São representadas também os filos a que pertencem cada família. <i>Other</i> - restantes famílias presentes em menor percentagem. Gráficos criados no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018).	25
Figura 11: Curvas de rarefação da comunidade fúngica obtidas por seqüências da região <i>ITS</i> do <i>rRNA</i> das amostras de solo com diferentes concentrações de <i>EucaBio_sólido</i>	26
Figura 12: Diversidade da comunidade fúngica encontrada nas amostras de solos. <i>S</i> : riqueza microbiana, <i>I-D</i> : índice de Gini-Simpson e <i>H'</i> : índice de Shannon. Diferentes letras significam diferenças estatisticamente significativas, onde as letras maiúsculas (A - D) se referem à diferença entre concentrações e as minúsculas (a - c) entre os tempos de cada concentração (Anexo 2).	27
Figura 13: Riqueza dos fungos isolados do solo, considerando todas as amostras. Gráfico criado em Krona (Ondov <i>et al.</i> , 2011).	28
Figura 14: Abundância relativa dos fungos isolados do solo, considerando todas as amostras. Gráfico criado em Krona (Ondov <i>et al.</i> , 2011).	29
Figura 15: Abundâncias relativas dos filos fúngicos (A) e das principais famílias fúngicas (B) reveladas pela sequenciação de amplicões das amostras de solo das diferentes condições. São representados os filos correspondentes as famílias. <i>Other</i> : restantes famílias presentes em menor percentagem. Gráficos criados no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018).	31

Figura 16: Análise multivariada da escala multidimensional não métrica (NMDS) das comunidades de bactérias (A) e de fungos (B), pelo coeficiente de Jaccard (bactéria 2D Stress = 0,12; fungo 2D Stress = 0,05)32

Índice de Tabelas

Tabela 1: Quantidades de EucaBio_sólido e de solo agrícola previamente recolhido em Vairão (Vila do Conde, Portugal), para preparação das diferentes concentrações de EucaBio_sólido a serem estudadas.13

Tabela 2: Lista de primers utilizados para sequenciação da comunidade bacteriana e fúngica de solos agrícolas com diferentes concentrações de EucaBio_sólido na plataforma *Illumina*. Sequenciação realizada pelo provedor de serviços de sequenciação (Genoinseq, Cantanhede, Portugal).15

Lista de Abreviaturas

μl – Microlitro

ASV – *amplicon sequence variant*

bp – Par de bases

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

ITS – *Internal transcribed spacer*

NMDS – *Non-metric Multidimensional Scaling*

p/p – peso/peso

p/v – peso/volume

PCR – *Polymerase chain reaction*

PGPR – *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*

rRNA – *ribosomal deoxyribonucleic acid*

v/v – volume/volume

1. Introdução

Uma grande área do território nacional encontra-se ocupada por espaços florestais (floresta, matos e terrenos improdutivos), que correspondem a cerca de 6,2 milhões de hectares (69,4 % do território nacional). A área correspondente de floresta é de 3,3 milhões de hectares, e compreende áreas arborizadas e temporariamente desarborizadas (superfícies cortadas, ardidadas e em regeneração) (ICNF, 2019). Estes valores fazem com que Portugal esteja entre os países europeus com maior percentagem de superfície florestal no território nacional (Reis, 2018). As florestas portuguesas são compostas por uma vasta variedade de espécies vegetais, sendo 72 % autóctones, como o sobreiro (*Quercus suber*), a azinheira (*Quercus ilex*), o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), o pinheiro-manso (*Pinus pinea*) e outros carvalhos (como *Q. robur* ou *Q. pyrenaica*) (ICNF, 2019). As restantes 28 % incluem espécies alóctones, as quais foram introduzidas nas florestas nacionais. A espécie que se destaca neste grupo, pela sua distribuição nas florestas portuguesas, é o eucalipto-comum (*Eucalyptus globulus*) que contabiliza cerca de 26 % da área florestal (que corresponde a 845 mil ha) (Figura 1, ICNF, 2019).

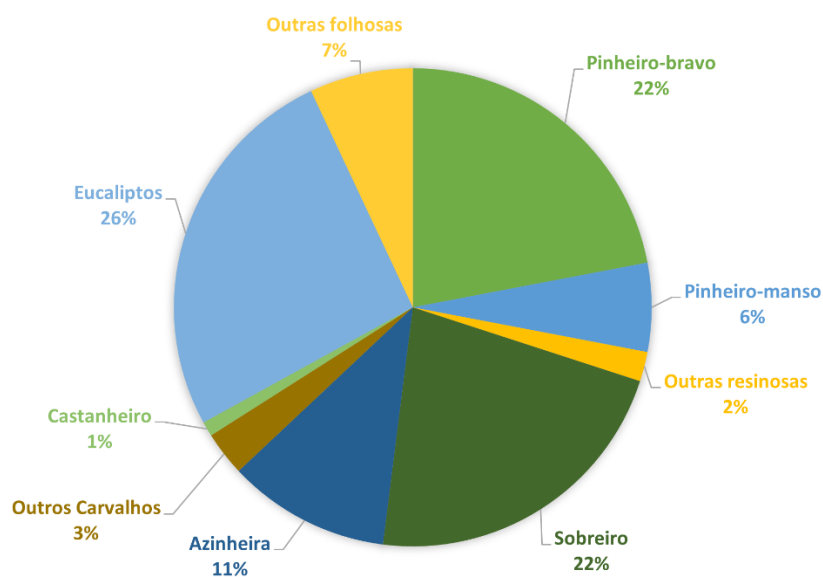


Figura 1: Principais espécies florestais presentes no território continental português e correspondente percentagem de área que ocupam no mesmo território (ICNF, 2019).

1.1. O eucalipto-comum

Eucalyptus globulus Labill., mais comumente conhecido como eucalipto, é uma espécie de árvore perene que pertence à família *Myrtaceae*, sendo nativa do sudeste da Austrália (Catry *et al.*, 2015; Moço, 2019). Esta espécie tem a capacidade de tolerar uma ampla gama de condições ambientais, como, por exemplo, solos deficientes em água e nutrientes (Cerasoli *et al.*, 2016). Esta característica permitiu que, desde a sua descoberta em 1792 (Potts *et al.*, 2004) até aos dias de hoje, o eucalipto esteja presente em todos os continentes (com exceção da Antártida) (Catry *et al.*, 2013; Catry *et al.*, 2015). Em Portugal, o eucalipto foi introduzido em meados do século XIX como árvore ornamental (Potts *et al.*, 2004). Contudo, a expansão das suas plantações só ocorreu no século XX, quando o eucalipto se torna uma importante fonte de matéria-prima para a produção de pasta para papel (Alves *et al.*, 2007). Atualmente, este sector apresenta uma elevada importância para a economia portuguesa. Adicionalmente, o eucalipto é utilizado noutras indústrias diferentes: madeira para mobiliário, construção civil e produção de carvão vegetal, fibras de celulose para produção de vários tipos papel, vestuário, decoração, cosméticos, fármacos, entre outros (Dhakad *et al.*, 2018; Bayle, 2019). Atualmente, outros usos referenciados incluem a produção de biocombustíveis e de bioenergia.

A distribuição de eucalipto ao longo da área continental portuguesa encontra-se em direta relação com as suas preferências ecofisiológicas (Alves, 2007). Na atualidade, as plantações ocorrem predominantemente no Litoral do país, com maior incidência na faixa litoral da região Centro (Alves, 2007). Estas plantações têm um crescimento rápido e uma elevada produtividade, sendo monoespecíficas em regime de talhadia e apresentando ciclos de produção de 12 anos (Soares, 2007). Portugal apresenta características, tanto de solo como de clima, que são ótimas para a propagação da espécie (Moço, 2019). Isto fez com que esta espécie, mesmo sendo exótica, se tenha alastrado pelo país causando algumas controvérsias sobre a sua classificação como planta invasora e sobre os seus efeitos nas florestas portuguesas (Fernandes, 2016; Catry *et al.*, 2015). A classificação como planta invasora pode variar segundo vários critérios. Assim, segundo a *Lista de Espécies Exóticas Invasoras que Suscitam Preocupação na União Europeia (List of Invasive Alien Species (IAS) of Union concern)*, que está presente no regulamento 1143/2014 da UE, *Eucalyptus globulus* não é considerada uma espécie invasora. Isto deve-se ao facto de ser considerado que a grande extensão de plantações de eucalipto que se observa em Portugal é o resultado da exploração por parte do homem, e não de uma dispersão natural (Potts *et al.*, 2008; Ezequiel *et al.*, 2019). Contudo, segundo o protocolo adaptado do *Australian Weed Risk*

Assessment (Morais *et al.*, 2017), esta é considerada uma espécie com comportamento invasor no território português (Marchante *et al.*, 2014). Isto baseia-se na observação do seu comportamento invasor em diversas situações no território nacional, e também devido à elevada pressão de propágulos, consequência da sua ampla distribuição (Marchante *et al.*, 2014). As plantações de eucalipto podem ter efeitos prejudiciais nas florestas portuguesas devido (i) a promoverem a diminuição da biodiversidade para todos os grandes grupos de espécies, desde de fungos até a vertebrados (em comparação com plantações de espécies nativas) (Tomé *et al.*, 2021), (ii) a consumirem exaustivamente os nutrientes presentes no solo e a drenarem os recursos hídricos (Bayle, 2019), (iii) a estarem associadas a uma elevada incidência de incêndios florestais, e (iv) a apresentarem uma rápida recuperação pós-fogo, em comparação às plantações das espécies nativas (Catry *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007; Catry *et al.*, 2015).

1.2. Eucalipto e os incêndios

Os fogos são fenómenos globais que afetam os ecossistemas e os processos que neles ocorrem, incluindo a distribuição e estrutura da vegetação, assim como o ciclo de carbono (Bowman *et al.*, 2009, Fairman *et al.*, 2015). A sua ocorrência está essencialmente dependente do combustível fornecido pela vegetação e da fonte de ignição, que pode ser o homem, ou eventos climáticos extremos como, por exemplo, temperaturas elevadas, associadas a ventos fortes, falta de precipitação ou humidade atmosférica reduzida (Flannigan *et al.*, 2013). Todos estes fatores são gravemente afetados pelas alterações climáticas, cujas previsões sugerem um agravamento dos incêndios, tanto em quantidade como em intensidade e duração (Liu *et al.*, 2010; Flannigan *et al.*, 2013). Portugal encontra-se na Bacia do Mediterrâneo, estando inserido numa das cinco regiões de clima do tipo mediterrânico, que incluem ecossistemas altamente propensos ao fogo (Keeley, 2012). Estas regiões caracterizam-se por invernos amenos e húmidos, e verões quentes e secos (Keeley, 2012). Como a precipitação frequentemente excede a evapotranspiração durante a estação chuvosa, ocorre um crescimento de plantas excessivo, suficiente para produzir uma carga contínua de combustível, que é altamente inflamável durante a estação seca do verão (Keeley, 2012). Assim, os incêndios têm vindo a ocorrer com bastante frequência nas regiões com este tipo de clima. Funcionando como agente seletivo, o fogo tem contribuído não só para a redução da diversidade genética das espécies, mas também para a composição e estruturação das comunidades mediterrânicas e diferenciação de nichos (Naveh, 1975; Águas, 2019). Em Portugal, estas características juntamente com o interesse económico do eucalipto levaram a uma gradual substituição das espécies nativas por esta espécie florestal.

Uma vez que no seu território nativo (Austrália) o eucalipto está naturalmente exposto à ocorrência de fogos (Booth, 2012), esta espécie desenvolveu várias características adaptativas ao fogo (dos Santos *et al.*, 2015). Estas potenciam a sua regeneração, assim como um rápido recrutamento e estabelecimento de eucaliptos em zonas de pós-fogo (dos Santos *et al.*, 2015). Isto ocorre devido à capacidade apresentada pelo eucalipto em emitir rebentos, a partir da base do tronco, assim como devido ao aumento da libertação de sementes (deiscência) para o solo após um incêndio (Catry *et al.*, 2013; dos Santos *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2021). Este processo ocorre uma vez que as pseudocápsulas lenhosas (frutos) desidratam após a ocorrência de um fogo, abrindo e libertando as sementes (dos Santos *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016). Embora este processo não seja exclusivamente dependente do fogo, pois também ocorre de forma natural em períodos de seca, após a ocorrência de um fogo, a libertação de sementes ocorre de uma forma massiva num curto período (Vega *et al.*, 2008; dos Santos *et al.*, 2015). As pseudocápsulas também têm a capacidade de proteger as sementes do calor, permitindo que continuem viáveis mesmo depois de um fogo (Silva *et al.*, 2016; Águas, 2019). Para além disso, o fogo cria condições que facilitam a germinação, pois remove a vegetação circundante resultando numa maior disponibilidade de luz, nutrientes e água, diminuindo a competição entre espécies (Águas *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2015). O fogo também afeta a composição do solo, tanto a nível de nutrientes, devido a acumulação de cinzas, como a nível dos microrganismos existentes, devido às temperaturas que o solo atinge (Águas *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2015). Apesar de tudo que foi referido anteriormente, o efeito benéfico da ocorrência de fogos para o eucalipto está fortemente dependente da sua intensidade e da época do ano em que ocorrem (Águas *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2015).

A maior incidência dos incêndios nas florestas onde predominam eucaliptos, quando comparada com outras florestas, pode estar relacionada com as características inflamáveis das folhas, que resultam principalmente dos compostos voláteis que acumulam (Bowman *et al.*, 2014; Kalabokidis & Palaiologou, 2019). A maior ocorrência de fogos nestas florestas é também uma consequência da acumulação de folhas e cascas que o eucalipto vai libertando (Oliveira *et al.*, 2021). Este último fator está diretamente relacionado com a gestão das áreas florestais, onde a inclusão de medidas de gestão regulares como desbastes, seleções de varas e limpezas de matos, podem reduzir os combustíveis que potenciam incêndios (Oliveira *et al.*, 2021). Em contrapartida, uma boa gestão florestal resulta numa menor área ardida. Exemplo disso são as zonas de florestação controladas por empresas da indústria papelreira associadas à CELPA, que entre 2008 e 2019 registaram uma média anual de área de eucalipto ardida de apenas 1,3 %, valor esse

bastante inferior à média nacional de 17,4 % para o mesmo período (CELPA, 2019; Oliveira *et al.*, 2021).

1.3. Eucalipto e os compostos aleloquímicos

A ocorrência de fogo na sua região nativa, desenvolveu no eucalipto características adaptativas também associadas com a sua elevada inflamabilidade (dos Santos *et al.*, 2015). Isto deve-se aos compostos que o eucalipto produz a partir do seu metabolismo secundário (Guerrero *et al.*, 2022). Os metabolitos secundários são uma vasta e diversificada variedade de compostos orgânicos, sendo que a maioria não parece participar diretamente no crescimento e desenvolvimento da planta. Não são assim essenciais para o desenvolvimento da planta, mas promovem a sua sobrevivência e proteção contra vários fatores abióticos ou bióticos (Zhang *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2012; Guerrero *et al.*, 2022). Os metabolitos secundários não são produzidos aleatoriamente, tendo sido otimizados ao longo da evolução das plantas. Por exemplo, muitos estão envolvidos em processos de alelopatia, intervindo na defesa química das plantas (Guerrero *et al.*, 2022). Alguns exemplos de alelopatia são os compostos produzidos para proteger a planta da radiação UV, do stress hídrico e aqueles que evitam a presença e desenvolvimento de vegetação circundante (Souto *et al.*, 2001; Tomé *et al.*, 2019; Guerrero *et al.*, 2022). Este último processo ocorre porque alguns aleloquímicos podem interferir de forma negativa com os processos fisiológicos e morfológicos de outras plantas, impedindo a normal divisão celular, alterando a estruturação da parede celular, a permeabilidade da membrana ou algumas atividades enzimáticas (Morsi & Abdelmigid, 2016). Para além do que já foi referido, os compostos aleloquímicos produzidos e libertados pelo eucalipto também afetam outros organismos, como fungos, bactérias e insetos, tendo já sido demonstrada atividade antifúngica e antimicrobiana por alguns compostos (Souto *et al.*, 2001; Sadlon & Lamson, 2010; Xu *et al.*, 2020).

Especificamente no eucalipto, os aleloquímicos estão presentes nas folhas, cascas, raízes, flores e frutos (Morsi & Abdelmigid, 2016). No entanto, alguns estudos referem um maior impacto alelopático por parte de extratos de folhas (Maharjan *et al.*, 2007; Morsi & Abdelmigid, 2016), em específico de folhas jovens (O'Reilly-Wapstra *et al.*, 2007). Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em direcionar estas propriedades aleloquímicas de compostos do eucalipto para o controlo de pragas e doenças que afetam plantas com valor económico (Puig *et al.*, 2013; Puig *et al.*, 2018). Desta forma, existe a possibilidade do desenvolvimento de novos produtos que contribuam para melhorar a produtividade agrícola, enquanto promovem a sustentabilidade,

reduzindo o impacto no ambiente e nos ecossistemas pela redução do uso de pesticidas/herbicidas sintéticos (Puig *et al.*, 2018).

1.4. Herbicidas sintéticos e as novas perspectivas

O crescimento da população mundial continua a ocorrer de forma acentuada e, segundo as Nações Unidas, estima-se que até 2050 a população mundial possa chegar aos 9,7 mil milhões (*United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2022*). Este aumento, embora menor do que se esperava devido à pandemia que afetou o mundo em 2020, irá resultar num aumento do número de pessoas afetadas por fome e desnutrição (FAO *et al.*, 2022). Desde 2015, que a prevalência de desnutrição permanecia relativamente inalterada, mas a partir de 2019 tem vindo a aumentar (FAO *et al.*, 2022). Estima-se que, em 2021, entre 702 e 828 milhões de pessoas foram afetadas pela fome e cerca de 2,3 mil milhões sofreram devido a uma insegurança alimentar moderada ou grave (FAO *et al.*, 2022).

A maior demanda de alimentos e produtos, principalmente derivados do setor agrícola, resulta numa agricultura muito dependente no uso de agroquímicos, na tentativa de aumentar a rentabilidade das culturas (Sharma *et al.*, 2019). Agroquímicos são substâncias utilizadas para facilitar o controlo de ecossistemas agrícolas ou de comunidades de organismos em áreas de cultivo, e podem ser: pesticidas, reguladores de crescimento de plantas, fertilizantes, condicionadores de solo e produtos químicos usados na pecuária (Koli *et al.*, 2019). Podemos classificar os pesticidas como qualquer substância ou mistura de substâncias usadas para matar, repelir ou controlar uma “praga”, incluindo insetos, caracóis, roedores, fungos, bactérias e ervas daninhas (Bolognesi, 2003; Maksymiv, 2015). De entre todos os pesticidas, os mais utilizados são os herbicidas, que representam cerca de 47,5 %, seguidos pelos inseticidas e os fungicidas (17,5 % e 5,5 %, respetivamente) (De *et al.*, 2014).

Previamente à descoberta dos herbicidas sintéticos, as ervas daninhas eram controladas através de monda, corte, remoção manual, aplicação de uma cobertura morta, rotação de culturas e uso de produtos químicos não sintéticos, como compostos de arsénio, sódio e enxofre (Osteen *et al.*, 2016; Duke & Dayan, 2018). Com a sua descoberta no início dos anos 40, os herbicidas sintéticos começaram a ser amplamente utilizados na agricultura e a sua aplicação continua a aumentar até aos dias de hoje (Duke & Dayan, 2018). Os herbicidas compreendem uma vasta gama de compostos químicos, geralmente identificados por meio de ensaios de triagem de atividade herbicida. Caso esta seja detetada, são posteriormente realizados ensaios adicionais em culturas com interesse económico para determinar a sua eficácia, seletividade, impacto ambiental

e efeitos fitotóxicos (Rebeiz *et al.*, 1984). Os herbicidas tendem a afetar processos específicos de plantas, como as vias bioquímicas, processos fisiológicos relacionados com a fotossíntese e a formação de biomoléculas fundamentais, sendo estes os açúcares, aminoácidos e ácidos gordos, ou a formação de macromoléculas (Dayan, 2019). Como é expectável, interferir com estes processos pode causar danos no desenvolvimento das ervas daninhas ou até mesmo conduzir à sua morte (Sherwani *et al.*, 2015).

Existem mais de 200 compostos ativos que servem de base para herbicidas, como glifosato, glufosinato, flazassulfurão e atrazina (Forouzesh *et al.*, 2015). O glifosato [N-(fosfometil) glicina] é um herbicida pós-emergente, não seletivo e de ação sistémica, que inibe a enzima sintetase do 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (EPSPS) (Duke & Powles, 2008). Esta enzima está presente na via metabólica do chiquimato, que é responsável pela produção de aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina (Duke & Powles, 2008; Sherwani *et al.*, 2015). O glufosinato é um herbicida de contacto e não seletivo que, por se ligar a glutamina sintase, inibe a fotossíntese (Takano & Dayan, 2020). Para além destes, existe uma ampla gama de mecanismos de ação dos herbicidas, desde inibidores da acetil-CoA carboxilase, até inibidores da síntese de ácidos nucleicos e de proteínas (Roman *et al.*, 2007).

À utilização de herbicidas, não estão apenas associados efeitos positivos para o controlo de ervas daninhas, dado que a maioria é altamente persistente no ecossistema. Não sendo biodegradável, os efeitos prejudiciais verificados no desenvolvimento de plantas permanecem por um longo período (Basu & Rao, 2020). Existem também evidências que apenas parte dos herbicidas aplicados são efetivamente utilizados no controlo local das plantas-alvo, sendo que a maior parte acaba por contaminar o ar, solo, água, podendo até afetar negativamente plantas não-alvo (Kudsk & Streibig, 2003; Marin-Morales *et al.*, 2013; Balderrama-Carmona *et al.*, 2020). Assim, o uso generalizado de herbicidas ao longo dos anos, resultou na acumulação de resíduos no meio ambiente, causando contaminações nos ecossistemas e provocando efeitos negativos à biota (Marin-Morales *et al.*, 2013). O solo é bastante afetado pelo uso de herbicidas, devido a processos de lixiviação, retenção, escoamento superficial ou absorção (Duke, 1989; Prince & Kelton, 2013). Com a ocorrência de todos estes processos, é expectável que os microrganismos presentes no solo também sejam bastante afetados nas suas atividades enzimáticas, quer qualitativamente ou quantitativamente (Latha & Gopal, 2010).

Devido aos impactos negativos causados pelos herbicidas sintéticos, o estudo de alternativas sustentáveis tem aumentado, principalmente nos últimos anos. Os bio-herbicidas

constituem uma alternativa aos herbicidas, podendo ser constituídos por organismos vivos (microrganismos) ou derivados de organismos vivos (extratos vegetais e aleloquímicos) produzidos durante o seu crescimento e desenvolvimento (Bailey, 2014; de Souza Barros *et al.*, 2021). Além de terem de ser eficientes e consistentes (formulações adequadas), os bio-herbicidas devem igualmente ser competitivos no preço para terem sucesso (de Souza Barros *et al.*, 2021). Deste modo, os compostos aleloquímicos produzidos por *Eucalyptus globulus* apresentam relevância como uma alternativa sustentável, tendo sido bastante explorados pela comunidade científica nos últimos anos (Puig *et al.*, 2013; Aragão *et al.*, 2015; Abou El-Ghit, 2016; Ibáñez Jaime & Blázquez Ferrer, 2018; Pinto *et al.*, 2021).

1.5. Microrganismos presentes no solo

O solo é a base de todos os ecossistemas terrestres e acolhe uma grande diversidade de bactérias, fungos, insetos, anelídeos e outros invertebrados, assim como plantas e algas (Aislabie *et al.*, 2013). Este é um sistema dinâmico complexo, que inclui componentes abióticos e bióticos, que se encontram relacionados por processos biológicos, físicos e químicos (Dominati *et al.*, 2010). Nele ocorrem vários processos, que estão no centro da sua formação, como, por exemplo, a reciclagem de água e nutrientes, ou atividades biológicas por parte das comunidades nele presentes (Dominati *et al.*, 2010).

As comunidades biológicas existentes no solo compreendem espécies de praticamente todos os principais grupos taxonómicos encontrados em ecossistemas terrestres (Swift *et al.*, 1979; Decaëns, 2010) e podem interagir de forma benéfica, nociva ou neutra com as plantas (Santoyo *et al.*, 2017). As interações benéficas possuem um particular interesse, uma vez que, podem ser direcionadas para melhorar e promover o crescimento, desenvolvimento e saúde das plantas em diversos contextos, em especial em plantas agrícolas (Santoyo *et al.*, 2012; Santoyo *et al.*, 2017; Khatoon *et al.*, 2020). Um exemplo de bactérias que têm características benéficas, são as *Plant Growth Promoting (Rhizo)Bacteria* (PGPR ou PGPB), que realizam associações de simbiose com as raízes na rizosfera (Miransari *et al.*, 2016) ou vivem livremente no solo (Shameer & Prasad, 2018). AS PGPR/PGPB podem apresentar diferentes mecanismos de ação, como a fixação de nitrogénio, solubilização de fosfato, sequestro de metais pesados, produção de fitohormonas [por exemplo, ácido indolacético (IAA), giberelinas ou citocininas], mineralização da matéria orgânica do solo, decomposição de resíduos de culturas, supressão de fitopatógenos, entre outros (Shameer & Prasad, 2018; He *et al.*, 2019; Khatoon *et al.*, 2020). Estes mecanismos tornam as PGPR úteis para as plantas crescerem mesmo em solos deficientes em nutrientes

(Khatoon *et al.*, 2020). Além disso, tal como evidenciado na Figura 2, algumas das fito-hormonas produzidas por estes microrganismos tem diferentes efeitos no desenvolvimento das plantas, podendo causar germinação de sementes, alongamento das raízes, crescimento de frutos, crescimento aéreo e radicular, entre outros (Khatoon *et al.*, 2020). O género *Rhizobium* é dos grupos de bactérias que recebe mais destaque como PGPR e é caracterizado pela sua relação de simbiose com plantas hospedeiras específicas, como as leguminosas, nas quais promove a formação de nódulos com capacidade de fixar nitrogénio atmosférico (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008, Miransari *et al.*, 2016). Bactérias do género *Azospirillum* apresentam também capacidade de fixar nitrogénio em condições microaeróbicas, assim como capacidade de produzir hormonas de crescimento vegetal, como o ácido indol-acético (IAA) (Jha & Saraf, 2015; Miransari *et al.*, 2016). Este género apresenta crescimento abundante, sobretudo na rizosfera de gramíneas. Outros géneros de PGPR muito predominantes são membros de *Pseudomonas* e *Bacillus*, que produzem algumas variedades de antibióticos, entre outras características de alguma importância (Miransari *et al.*, 2016; Muthukumar *et al.*, 2022).

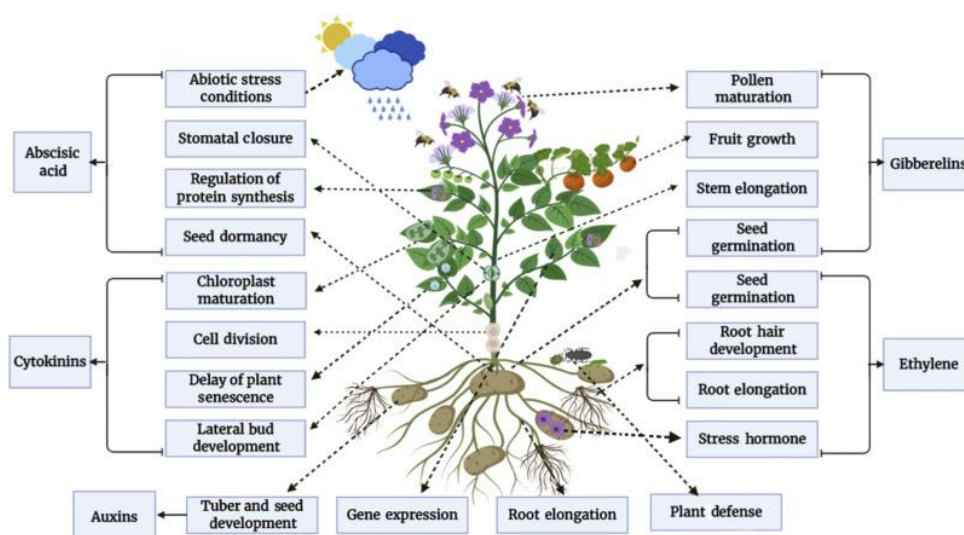


Figura 2: Representação das diversas fito-hormonas produzidas por PGPR e as alterações que estas podem induzir no desenvolvimento de plantas (Khatoon *et al.*, 2020).

No solo existem também bactérias fitopatogénicas, que causam doenças nas plantas. Alguns dos sintomas que estas podem provocar são manchas, cancrs, apodrecimento de tecidos, desequilíbrios hormonais (que podem levar ao crescimento excessivo), atrofia no desenvolvimento, ramificação de raízes e epinastia foliar, entre outros, sendo o mais grave a morte da planta (Kannan *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2018). Exemplos deste tipo de bactérias são as espécies presentes na *Lista dos 10 Principais Patógenos Bacterianos de Plantas*, sendo eles: *Pseudomonas syringae* pvs, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*,

Xanthomonas campestris pvs, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*, *Erwinia amylovora*, *Xylella fastidiosa*, *Dickeya (dadantii e solani)* e, por fim, *Pectobacterium carotovorum* (e *P. atrosepticum*) (Mansfield *et al.*, 2012).

Tal como nas bactérias, os fungos também apresentam características benéficas, sendo que os fungos saprófitas e os micorrízicos encontram-se em elevada abundância nos solos. Os fungos saprófitas são extremamente importantes para o ecossistema do solo, pois sendo decompositores libertam nutrientes importantes para o crescimento sustentado das plantas (Dighton, 2007; Pereira *et al.*, 2012). As micorrizas resultam da associação mutualística entre fungos e raízes de plantas, sendo que ocorre em quase 80 % das plantas terrestres (Sylvia, 2005). Existem quatro tipos principais de micorrizas, com base nos critérios de diferenciação morfológica dos tecidos radiculares e também dos grupos taxonômicos das plantas hospedeiras: micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, micorrizas ericáceas e micorrizas orquidóides (Brundrett & Tedersoo, 2018). As micorrizas arbusculares são caracterizadas por colonizarem o interior das células e formarem estruturas ramificadas, também conhecidas por arbúsculos (Brundrett & Tedersoo, 2018). São conhecidas por auxiliarem a eficiência da planta hospedeira de diversas maneiras – por exemplo, melhorando o crescimento e a biomassa das raízes, assim como dos rebentos das plantas, regulando positivamente a absorção de nutrientes e água e aumentando a sobrevivência sob stress ambiental (Denton, 2007; Smith e Read, 2008). Os fungos arbusculares encontram-se principalmente no filo Glomeromycota. Os fungos ectomicorrízicos são caracterizados pela presença de um manto fúngico que envolve as raízes do hospedeiro e a rede *Hartig* (hifas que penetram no espaço intercelular no córtex radicular para formar uma rede de micélio fúngico) que envolve as células epidérmicas ou corticais da raiz (Johnson & Gehring, 2007; Marschner, 2023). Estas estruturas são muito eficientes ao fornecerem uma extensa área de superfície para troca de recursos entre planta e fungo, o que faz com que as ectomicorrizas desempenhem um papel importante no ciclo de nutrientes e na composição do solo, providenciando serviços necessários para o crescimento de plantas lenhosas, incluindo benefícios nutricionais e tolerância a vários stresses ambientais (Smith e Read 2008). Os fungos ectomicorrízicos representam um conjunto diversificado de pelo menos 6.000 espécies pertencentes aos filios *Basidiomycota*, *Ascomycota* e *Zygomycota* (Johnson & Gehring, 2007; Smith and Read, 2008). Para além de muitos fungos apresentarem múltiplos efeitos benéficos, muitos apresentam fitopatogenicidade, principalmente membros dos filios *Ascomycota* e *Basidiomycota* (Doehlemann *et al.*, 2017). Estes patógenos podem ser separados em dois grupos principais: patógenos biotróficos, que formam interações íntimas com plantas, nutrindo-se dos tecidos vivos

da planta hospedeira, e patógenos necrotróficos, que matam o tecido para extrair nutrientes (Doehlemann *et al.*, 2017). Um exemplo de patógeno necrotrófico é o fungo *Fusarium graminearum*, causador da fusariose da espiga que afeta plantações de trigo e de cevada (Quarantin *et al.*, 2019; Rauwane *et al.*, 2020). Este patógeno é conhecido por produzir enzimas e toxinas que degradam a parede celular, fazendo com que o tecido vegetal perca firmeza, ocorra a sua maceração e o vazamento do conteúdo celular (Rauwane *et al.*, 2020). Outra espécie pertencente ao género *Fusarium*, *Fusarium oxysporum*, é considerada um patógeno hemibiotrófico porque começa o seu ciclo de infeção como biotrófico, mas mais tarde muda para necrotrófico (Lyons *et al.*, 2015). Este é conhecido por causar murchidão nas plantas hospedeiras, habitando no solo por muito tempo na forma de clamidósporos, os quais após germinação conduzem à penetração do fungo nas raízes, proliferação nos tecidos vegetais e colonização dos vasos do xilema, que causa o amarelamento sistémico, a murchidão e até mesmo a morte da planta (Arie, 2019). Esta espécie afeta variadas culturas agrícolas com importância económica como, por exemplo, as culturas de tomate, banana, algodão, entre outras (Arie, 2019; Carmona *et al.*, 2020; Asai *et al.*, 2021). A presença de muitas destas espécies patogénicas é devastadora para as culturas agrícolas, tendo um enorme impacto económico, com perdas em todo o mundo, todos os anos (Kannan *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2018).

1.6. Objetivos da tese

Este trabalho enquadram-se no projeto FCT - PEST(bio)CIDE (PCIF/GVB/0150/2018) que visa, através da valorização da biomassa foliar do eucalipto-comum, oferecer uma resposta para melhorar a gestão das áreas de eucalipto regeneradas após um incêndio florestal. Propõe a utilização da biomassa foliar de eucalipto como bio-herbicida, denominado EucaBio, baseando-se no potencial fitotóxico das folhas do eucalipto.

Têm como objetivo principal avaliar os efeitos da aplicação de um herbicida natural, obtido através de folhas de eucalipto (designado de EucaBio_sólido), nas comunidades microbianas (fungos e bactérias) presentes no solo. Para atingir este objetivo foram realizados ensaios experimentais com a aplicação de diferentes concentrações de EucaBio_sólido, de forma a conseguir avaliar que concentrações de herbicida apresentam maior impacto nas comunidades microbianas. A microbiota do solo foi caracterizada por sequenciação de alto rendimento, utilizando a sequenciação por *Illumina* dos amplicões *ITS2* (para fungos) e *16S* rRNAs (para bactérias). Após a caracterização das comunidades bacterianas e fúngicas dos solos tratados com EucaBio_sólido, é pretendido avaliar especificamente quais as concentrações de herbicida que

podem afetar negativamente os serviços ecológicos fornecidos pela microbiota do solo. De igual modo, utilizando uma amostragem ao longo do tempo, é igualmente pretendido avaliar a persistência dos efeitos do EucaBio_sólido no solo, após a sua aplicação.

2. Material e Métodos

2.1. EucaBio_sólido

O herbicida (EucaBio_sólido) utilizado neste trabalho foi, gentilmente, cedido pelo grupo de investigação da GreenUPorto – Centro de Investigação em Produção Agroalimentar Sustentável (Universidade do Porto), parceiros no projeto PEST(bio)CIDE (PCIF/GVB/0150/2018), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). O EucaBio_sólido consiste em rebentos de *Eucalyptus globulus*, que brotaram em zonas de ocorrência de incêndios no Verão de 2020, mais precisamente numa área florestal de Sobrado, perto do Porto (N 41.200402, W 8.476306). As folhas foram manualmente retiradas desses rebentos, sendo posteriormente secas numa estufa a 60 °C, até atingir peso constante. As folhas desidratadas foram reduzidas a pequenos fragmentos e utilizadas como bio-herbicida (denominado como EucaBio_sólido), por incorporação no solo (Figura 3).

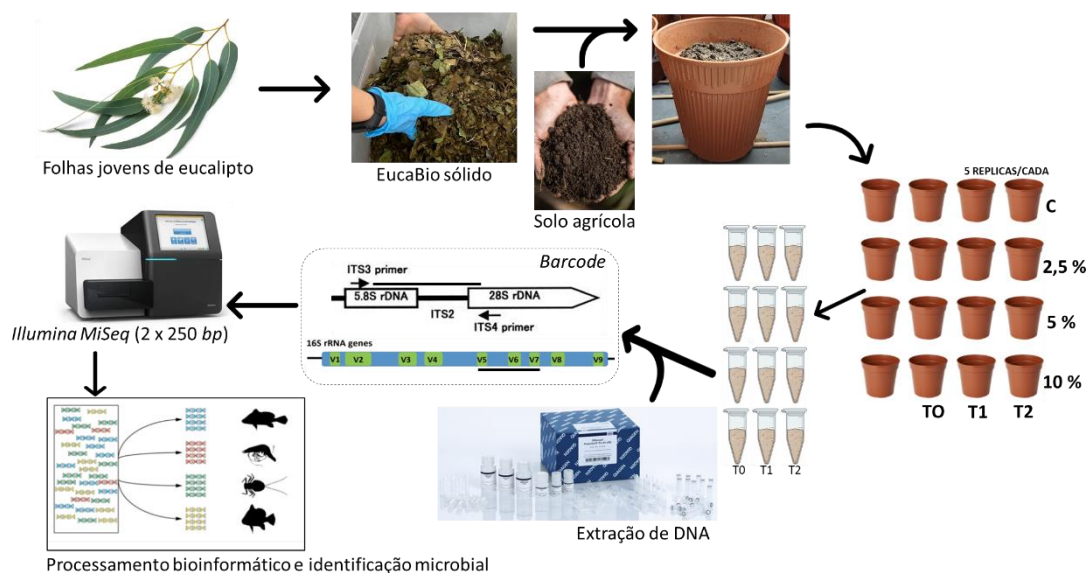


Figura 3: Metodologia experimental utilizada para a elaboração deste trabalho. Folhas jovens de eucalipto foram desidratadas e posteriormente incorporadas em solo agrícola a diferentes concentrações, foram realizadas recolhas de amostras de solo em 3 tempos diferentes (com intervalos de 2 semanas) e, posteriormente, realizou-se a extração de DNA com a utilização de kits apropriados, sequenciação por *Illumina* e análise dos dados com recurso a ferramentas bioinformáticas.

2.1.1. Efeito do EucaBio_sólido em ensaios em vaso

O herbicida biológico, EucaBio_sólido, foi incorporado em solo agrícola recolhido em Vairão (Vila do Conde, Portugal), de forma a testar o seu efeito na comunidade microbiana (Figura 3). Para isso, foram misturados 400 g de solo e diferentes quantidades (g) de EucaBio_sólido, de modo a estudar diferentes concentrações (p/p), sendo as misturas depois colocadas em vasos de plástico (750 ml) (Tabela 1). Para cada condição foram realizadas cinco réplicas. Após a introdução em vaso, as misturas de solo foram deixadas a estabilizar por duas semanas, numa sala de crescimento de culturas com temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 16 h dia/8 h noite. Os vasos foram regados em dias alternados, de modo a evitar a desidratação do solo. Após o período de estabilização (14 dias) foi realizada uma amostragem do solo (T0), tendo sido então semeada aveia (10 sementes por vaso). As sementes de aveia tinham sido previamente desinfetadas para prevenir o desenvolvimento de doenças, por submersão em álcool etílico (70 % v/v) por 10 minutos, seguida de submersão em lixívia comercial (20 % v/v) durante 7 minutos e de lavagens com água destilada (pelo menos 5 lavagens). Uma segunda amostragem do solo (T1) foi realizada 14 dias após a sementeira e uma terceira amostragem (T2) foi realizada 14 dias após a anterior, para avaliar o efeito do EucaBio_sólido na comunidade microbiana ao longo do tempo. Em cada um dos tempos de amostragem e em cada vaso, a recolha de amostras foi realizada em triplicado com um cilindro coletor com 10 cm de altura e 2 cm de diâmetro. Por cada vaso, todas as réplicas (recolhidas em pontos equidistantes) foram colocadas em tubos Falcon® de 50 mL estéreis e misturadas por homogeneização. Apenas uma parte da mistura foi guardada em 2 tubos *Eppendorf* de 2 mL e armazenada a - 80 °C.

Tabela 1: Quantidades de EucaBio_sólido e de solo agrícola previamente recolhido em Vairão (Vila do Conde, Portugal), para preparação das diferentes concentrações de EucaBio_sólido a serem estudadas.

Concentrações	EucaBio_sólido (g)	Solo (g)
Controlo	0	
2,5%	10	
5%	20	400
10%	40	

2.1.2. Extração de DNA

O DNA do solo foi extraído de cada amostra utilizando o kit de extração *DNeasy PowerSoil Pro Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Após

quantificação, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific), o DNA obtido foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os *primers* universais do código de barras de DNA para fungos, de forma a avaliar a sua integridade e capacidade de amplificação. Especificamente, a região *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* (Figura 4) foi amplificada usando os *primers ITS3* (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3', White *et al.*, 1990) e *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', White *et al.*, 1990).

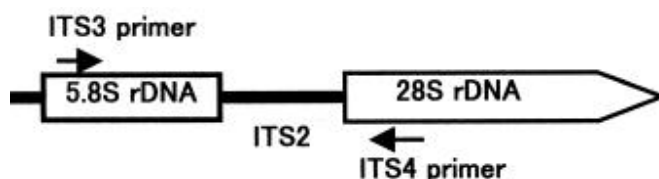


Figura 4: *Primers* usados para amplificar a região *ITS2* do *barcode* fúngico. *ITS3*: *Primer forward*; *ITS4*: *Primer reverse*; *5.8S rDNA*; *ITS2*: *Internal transcribed spacer 2*; *28S rDNA*: *28S nuclear ribosomal large subunit*.

A reação de PCR continha 0,1 μ M de cada *primer forward* e *reverse*, 2,68 U/ μ l de NZYTaQ II 2x Green Master Mix® (NZYTech, Portugal) e 1 μ l de DNA, sendo o volume da reação perfeito a 25 μ l com água ultra pura estéril. O PCR foi realizado num *Termociclador T100* (Bio-Rad, EUA) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 4 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C e 30 s a 72 °C; alongamento final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese num gel de agarose (1,5 %; p/v). Para permitir a visualização do DNA, adicionou-se ao gel de agarose 0,1 % (v/v) de *GreenSafe buffer* (NZYTech, Portugal). O marcador *100 bp plus ready-to-use DNA Ladder* (BIORON, Alemanha) foi utilizado para verificar a dimensão (pb) dos fragmentos amplificados. A eletroforese decorreu a 100 V durante 30 min. O gel de agarose foi analisado com recurso a um transiluminador (VWR GenoSmart).

2.1.3. Preparação e sequenciação das amostras de solos

Para quantificar com precisão a concentração de DNA das amostras, um ensaio de quantificação de DNA fluorescente foi realizado com o *dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA). A fluorescência específica do DNA foi então quantificada usando o fluorómetro *Qubit 3.0* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Todas as amostras de DNA foram enviadas para um provedor de serviços de sequenciação (Genoinseq, Cantanhede, Portugal).

As amostras foram preparadas para sequenciação na plataforma *Illumina*, pelo provedor de serviços de sequenciação Genoinseq. Foi realizada a sequenciação da região *V5-V7* do gene *16S rRNA* e da região *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* para a comunidade bacteriana e fúngica, respetivamente. O DNA foi amplificado para as regiões hiper-variáveis com *primers* específicos e posteriormente reamplificado numa reação de PCR de ciclo limitado para adicionar adaptadores de sequenciação e índices duplos. As primeiras reações de PCR foram realizadas para cada amostra usando o kit *KAPA HiFi HotStart PCR*, de acordo com as recomendações do fabricante e utilizando 0,3 µM de cada *primer* (Tabela 2) e 2,5 µl de DNA de cada amostra num volume total de 25 µl. As condições de PCR envolveram uma desnaturação de 3 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 98 °C por 20 s, 58 °C (bactérias)/60 °C (fungos) por 30 s e 72 °C por 30 s e uma extensão final a 72 °C por 5 min. As segundas reações de PCR adicionaram índices e adaptadores de sequenciação a ambas as extremidades da região alvo amplificada, de acordo com as recomendações do fabricante (Illumina, 2013). Controlos negativos de PCR foram incluídos para todos os procedimentos de amplificação. Os produtos de PCR foram então purificados numa etapa e normalizados usando o kit *SequalPrep 96-well plate* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) (Comeau, Douglas, & Langille, 2017), sendo posteriormente agrupados e sequenciados (*paired-end*) no sequenciador *Illumina MiSeq®* com o *MiSeq Reagent Kit v3*, de acordo com as instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, EUA).

Tabela 2: Lista de *primers* utilizados para sequenciação da comunidade bacteriana e fúngica de solos agrícolas com diferentes concentrações de EucaBio_sólido na plataforma *Illumina*. Sequenciação realizada pelo provedor de serviços de sequenciação (Genoinseq, Cantanhede, Portugal).

	Primer	Sequência (5´-3´)	Referência
Bactérias	799F	AACMGGATTAGATACCKG	Chelius & Triplett, 2001
	1193R	ACGTCATCCCCACCTTCC	Bodenhause <i>et al.</i> , 2013
Fungos	ITS3NGS1_F	CATCGATGAAGAACGCAG	Tedersoo <i>et al.</i> , 2014
	ITS3NGS2_F	CAACGATGAAGAACGCAG	
	ITS3NGS3_F	CACCGATGAAGAACGCAG	
	ITS3NGS4_F	CATCGATGAAGAACGTAG	
	ITS3NGS5_F	CATCGATGAAGAACGTGG	
	ITS3NGS10_F	CATCGATGAAGAACGCTG	
	ITS4NGS001_R	TCCTSCGCTTATTGATATGC	

2.1.4. Análise de sequências usando ferramentas de bioinformática

Os dados obtidos a partir da sequenciação foram inicialmente processados no provedor de serviços de sequenciação Genoinseq (Cantanhede, Portugal). As *raw reads* foram extraídas do sistema *Illumina MiSeq®* no formato *fastq*, e filtrados por qualidade com o *PRINSEQ* versão 0.20.4 (Schmieder & Edwards, 2011), para remover os adaptadores de sequenciação, remover bases com qualidade média inferior a Q25 numa janela de 5 bases e eliminar *reads* com menos de 100 bases para a ambas as regiões *ITS2* e *16S* rRNA. O *trimming*, com base nos índices de qualidade, foi realizado usando parâmetros padrão no *Sickle* (Joshi & Fass, 2011). O módulo *Bayeshammer* do pacote *SPAdes* (Nurk *et al.*, 2013; Nikolenko *et al.*, 2013) foi utilizado para corrigir erros nas *reads* antes do *merging*. A fusão das sequências emparelhadas (*merging*) e uma filtragem de qualidade adicional (em que número máximo de erros esperados é de 0,5) foi realizada utilizando o *Usearch* versão 11.0.667 (Edgar *et al.*, 2013). Uma filtragem baseada na dimensão da sequência foi realizada com *fastq-mcf* do pacote *ea-utils* (Aronesty, 2011), com a finalidade de utilizar apenas as sequências com a dimensão esperada para cada amplicão (bactérias entre 397 e 425 pb; fungos entre 320 e 450 pb). Foi usado o *pipeline* do software *micca* versão 1.7.0 (Albanese *et al.*, 2015): (i) para carregar os conjuntos de dados num único arquivo FASTQ (*micca merge*), (ii) para remover sequências que apresentam uma taxa de erro maior que 1% (*micca filter*), (iii) para agrupar sequências semelhantes em *amplicon sequence variants* (ASVs) – protocolo *UNOISE3* e remover sequências quiméricas (*micca otu*), (iv) para atribuir taxonomia a cada ASV a partir de um banco de dados de referência [UNITE versão 8.3 (Kõljalg *et al.*, 2020) para fungos; Silva versão 132 (Quast *et al.*, 2013) para bactérias] compatível com *qiime* (*micca classify*), e ainda (v) para converter o ficheiro para o formato *biom* (*micca tobiom*).

Os ASV atribuídos como não classificados, e os ASV não correspondentes a ASV fúngicos ou bacterianos (cloroplastos e mitocôndrias) foram removidos. Procedeu-se à normalização de cada conjunto de dados utilizando o *qiime* versão 1.9.0 (Caporaso *et al.*, 2010) para o número de sequências na amostra com o menor número de sequências (14.002 sequências de fungos, encontrada na amostra Control_T0_R4; 16.807 sequências de bactérias, encontrada na amostra 2.5%_T2_R1) (Anexo 1).

2.1.5. Análise de dados

As análises de dados foram realizadas usando os conjuntos normalizados no R versão 4.2.1 (R Core Team, 2022). Foram calculadas as curvas de rarefação para determinar o esforço de amostragem usando *rarecurve()* do pacote *vegan* (Oksanen *et al.*, 2022). Para calcular a diversidade α utilizou-se a função *alfa()* do pacote *microbiome* (Lahti *et al.*, 2017) que permitiu determinar, para diferentes grupos de amostras, a riqueza (S) e a diversidade (Gini-Simpson ($1-D$) e Shannon (H)) fúngica e bacteriana. A riqueza (S) corresponde ao número total de ASVs encontrados na amostra, sendo a medida mais simples de diversidade de uma comunidade. O índice de Gini-Simpson é influenciado pela riqueza e pela equatibilidade de uma comunidade, dando mais importância ao último, e representa a probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente serem de diferentes espécies (Magurran *et al.*, 1988; Chao *et al.*, 2014). Este índice aumenta à medida que a diversidade de uma comunidade aumenta, variando de 0 a 1. No índice de Shannon ocorre o contrário, isto é, dá mais importância à riqueza. Este índice representa a incerteza com a qual podemos prever de qual espécie será um indivíduo selecionado aleatoriamente de uma comunidade (Hughes & Bohannan, 2004; Chao *et al.*, 2014). Estes parâmetros ecológicos foram comparados entre amostras das diferentes concentrações de bio-herbicida para os três tempos (T0, T1 e T2). A sua análise estatística foi realizada usando *stat_compare_means()* do pacote *ggpubr* (Kassambara, 2023). De modo a explorar a riqueza e abundância relativa geral das comunidades analisadas neste trabalho, considerando a classificação taxonômica das ASVs identificadas, foram gerados esquemas *Krona* (Ondov *et al.*, 2011). A abundância relativa e riqueza de fungos e bactérias foram determinadas para as diferentes condições usando os pacotes *microbiome* (Lahti *et al.*, 2017) e *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) e os respectivos gráficos foram gerados no *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, 2018).

Uma análise multivariada da escala multidimensional não métrica (NMDS) foi realizada utilizando dados previamente transformados com raiz quadrada, de modo a atenuar a importância de espécies dominantes, para entender a distribuição da comunidade. Foi realizada a NMDS usando *vegdist()* do pacote *vegan* (Oksanen *et al.*, 2022) para calcular as matrizes dos índices de dissimilaridade de Jaccard, *envfit()* para entender a qualidade do ajuste (999 permutações) de fatores de variáveis ambientais e o *GraphPad Prism 8.00* (GraphPad Software) para obter o gráfico de ordenação. A comparação estatística entre as diferentes condições foi efetuada através de PERMANOVA, utilizando a função *adonis()* do pacote *vegan* (Oksanen *et al.*, 2022) com 1000

permutações, e também foi realizado o teste de ANOSIM, utilizando a função *anosim()* do mesmo pacote (Clarke & Madwick, 2015). Ambos usaram a matriz de dissimilaridade de Jaccard (Clarke & Madwick, 2015).

3. Resultados e discussão

3.1. Extração e amplificação de DNA

As amostras de solo foram extraídas utilizando o *DNeasy PowerSoil Pro Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) que é amplamente usado, demonstra estar bem otimizado para extração de DNA de solos e apresenta especificidade para o isolamento de DNA fúngico e bacteriano (Costa *et al.*, 2015; Lear *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2022). As amostras de DNA obtidas foram amplificadas com *primers* para as regiões *ITS*, com o objetivo de determinar que não havia contaminantes nas amostras e que o DNA presente nas mesmas podia ser amplificado. A obtenção de amplicões foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (Figura 5). Após quantificação, as amostras foram enviadas ao provedor de serviços de sequenciação para preparar as bibliotecas *16S* e *ITS* a serem sequenciadas usando a plataforma de sequenciação *Illumina MiSeq*.

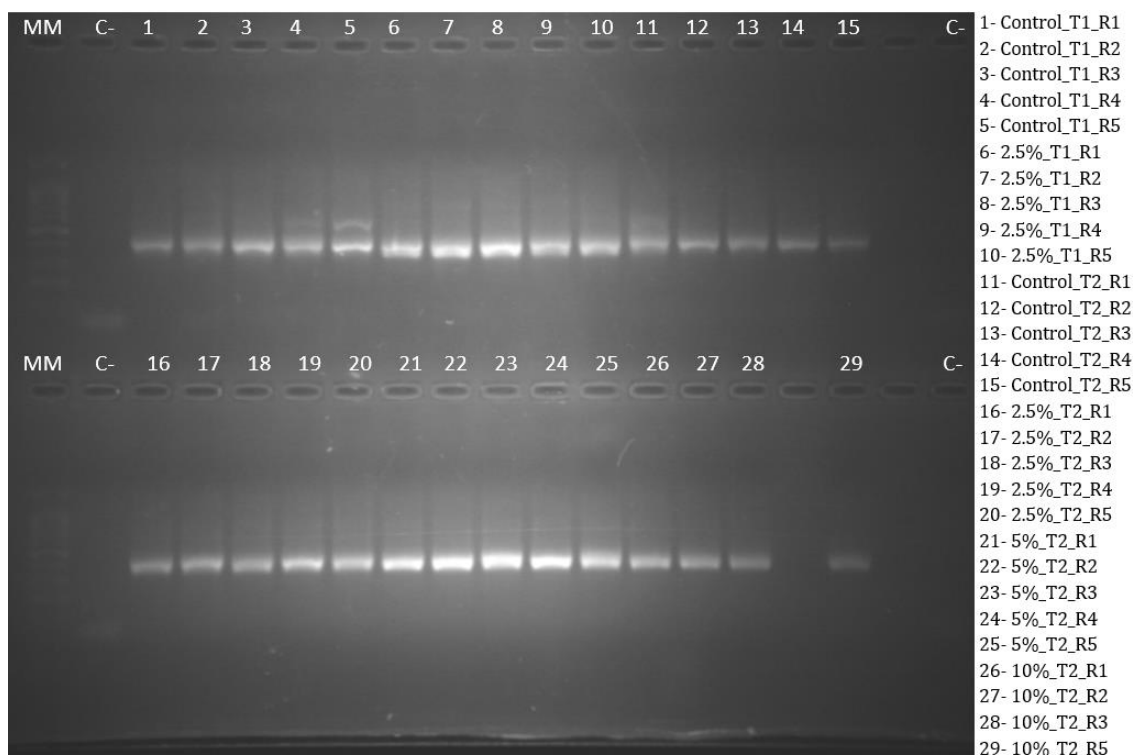


Figura 5: Detecção representativa de fragmentos amplificados das regiões *ITS* das amostras de solo com diferentes concentrações de Eucalyptus, através de eletroforese em gel de agarose (1,5 %, p/v). Para a amplificação foram utilizados os *primers* universais *ITS3* e *ITS4*. As referências de 1 a 29 referem a amplificação de DNA fúngico das amostras de solos, discriminadas à direita. C- : controlo negativo; MM: Marcador Molecular 100 bp.

3.2. Sequenciação e controlo de qualidade

A análise das sequências obtidas da região *16S* e *ITS* foi efetuada utilizando uma *pipeline*, baseada em Costa *et al.*, (2021). Utilizando o código de barras *16S* (*V5-V7*), foi obtido um total de 4.793.810 *raw reads* para as 60 amostras de solo, variando estas entre 15.950 e 215.458 *raw reads* por amostra. As *raw reads* foram processadas, como referido na secção Material e Métodos, tendo resultado em 2.077.925 sequências, que continham uma baixa percentagem de sequências não bacterianas (0,53 %). Após remoção dessas sequências, foi obtido um total de 2.066.916 sequências. Para atenuar possíveis enviesamentos decorrentes da variabilidade no número de sequências em cada amostra, foi realizada uma normalização da base de dados para o número de sequências bacterianas encontradas na amostra com menor número de sequências (16.807 sequências, encontradas na amostra 2.5% T2_R1) (Anexo 1). No final, foram obtidas 1.008.420 sequências e 14.914 ASV bacterianos.

Para os dados fúngicos foi utilizada a mesma metodologia. A partir das 60 amostras de solo foram obtidas de 6.338.294 *raw reads* da região *ITS2*, variando entre 31.262 e 217.773 *raw reads* por amostra. Após os filtros de qualidade, o número de sequências processadas e de elevada qualidade atingiu 4.591.949. A atribuição taxonómica revelou 8,6 % sequências não fúngicas, incluindo 6,2 % sequências não-classificadas e 1,7 % sequências não identificadas, 0,4 % sequências de Viridiplantae e 0,2 % de Alveolata. Após a sua remoção, foi realizada a subamostragem dos dados fúngicos para a amostra com o menor número de sequências fúngicas (14.002 sequências, encontradas na amostra Control_T0_R4) (Anexo 1). No final de todo o processamento foram obtidas 840.120 sequências e 5.607 ASVs fúngicos.

3.3. Comunidades microbianas no solo: diversidade e composição

3.3.1. Comunidade bacteriana

A riqueza e diversidade da comunidade bacteriana foi comparada entre as diferentes condições utilizando curvas de rarefação e índices de diversidade, ambos normalizados para o número mínimo de sequências em todas as amostras (16.807). As curvas de rarefação dão indicação sobre a riqueza existente, representando o número de ASVs em função das *reads* obtidas, permitindo igualmente avaliar a profundidade da amostragem, pelo tipo de curva obtida. As curvas apresentam geralmente um rápido crescimento inicial, à medida que as espécies mais comuns são encontradas. Quando apenas as espécies mais raras permanecem para serem

amostradas, as curvas tendem a estabilizar, atingindo-se um *plateau*. Se a curva de rarefação atingir o *plateau*, significa que a profundidade na amostragem foi adequada, indicando que o número de amostras (*reads* sequenciadas) é suficiente e o seu incremento não teria um efeito significativo no número ASVs. A maioria das curvas de rarefação relativas aos dados das bactérias (Figura 6) aparentam estar perto de atingir *plateau*, principalmente às curvas referentes à concentração 10 %, indicando que a profundidade na amostragem foi adequada. É igualmente evidente uma diferença a nível da riqueza bacteriana nas diferentes concentrações de EucaBio_sólido. A situação controlo, sem bio-herbicida adicionado, apresenta uma maior riqueza, vindo esta a diminuir com concentrações crescentes de EucaBio_sólido. Apenas pela observação das curvas de rarefação, é possível constatar a existência de quatro conjuntos de curvas, sugerindo que a condição que terá maior impacto na riqueza bacteriana será a concentração de bio-herbicida.

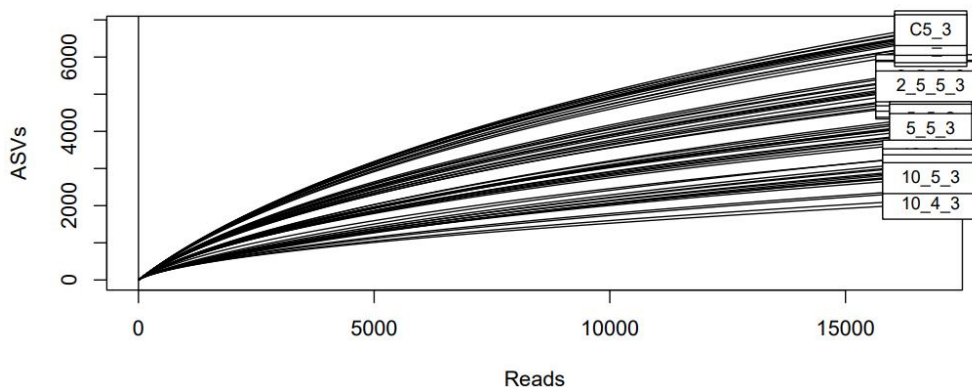


Figura 6: Curvas de rarefação da comunidade bacteriana obtidas por sequenciação da região 16S do rRNA presente nas amostras de solo com diferentes concentrações de EucaBio_sólido.

A variação na diversidade da comunidade bacteriana foi determinada por diferentes índices de diversidade (Figura 7). Os índices de diversidade mostraram diferenças estatisticamente significativas na comunidade bacteriana presente nas amostras de solo com diferentes concentrações de bio-herbicida. O controlo apresenta uma riqueza (S) e diversidade ($1-D$ e H') superior, seguindo-se das concentrações de EucaBio_sólido de 2,5 %, 5 % e 10 %. Quando é considerada a variação temporal, verificam-se diferenças menos significativas, apesar de haver uma tendência para uma redução da diversidade ao longo do tempo (Figura 7; Anexo 2). No seu conjunto, os resultados indicam que o aumento da concentração de bio-herbicida apresenta um impacto negativo na riqueza e diversidade da comunidade bacteriana, que se acentua quanto

maior o período de contacto. Resultados semelhantes são encontrados em estudos realizados com herbicidas sintéticos (Moretto *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022; Bhardwaj *et al.*, 2024).

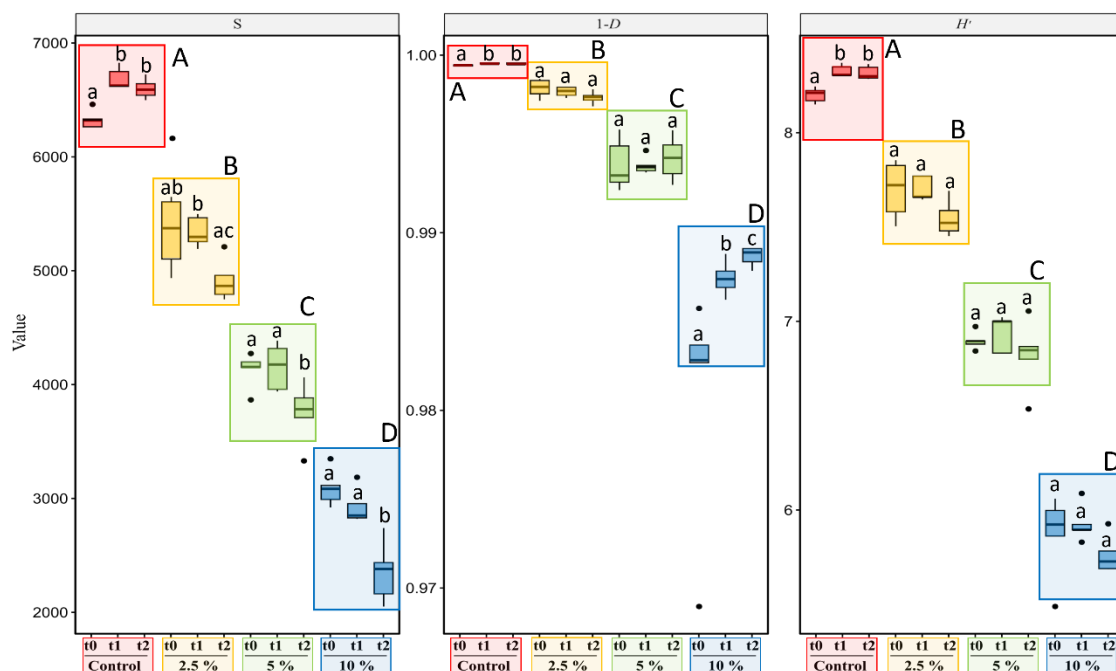


Figura 7: Diversidade da comunidade bacteriana encontrada nas amostras de solos. *S*: riqueza microbiana, *1-D*: índice de Gini-Simpson e *H'*: índice de Shannon. Diferentes letras significam diferenças estatisticamente significativas, onde as letras maiúsculas (A-D) se referem à diferença entre concentrações de EucaBio_sólido e as minúsculas (a-c) entre os tempos de aplicação de cada concentração (Anexo 2).

Em termos da composição da comunidade bacteriana no conjunto de todas as amostras analisadas, verificou-se que os ASVs se distribuíram por 13 filos, 36 classes, 74 ordens, 142 famílias, 224 géneros e 134 espécies. De salientar que muitos ASVs não foram classificados nos níveis taxonómicos mais específicos. No conjunto das comunidades bacterianas analisadas (Figura 8), os filos que apresentam maior riqueza são *Proteobacteria* (37 % das ASVs), *Actinobacteria* (21 %), *Acidobacteria* (10 %), seguido de *Planctomycetes* (7 %), *Bacteroidetes* (5 %) e *Verrucomicrobiae* (5 %). No que diz respeito ao filo *Proteobacteria* foram identificadas três classes muito representadas, *Alphaproteobacteria* (47 % das ASVs de membros de *Proteobacteria*), *Gammaproteobacteria* (41%) e *Deltaproteobacteria* (12 %). Para o filo *Actinobacteria* mais de metade dos membros pertencem à classe *Actinobacteria* (51 % das ASVs de membros de *Actinobacteria*), enquanto os restantes pertencem às classes *Thermoleophila* (36 %) e *Acidimicrobiia* (9 %). O filo *Acidobacteria* é caracterizado pela predominância da classe *Acidobacteriia* (60 % das ASVs de membros do filo). No filo *Planctomycetes*, a classe

Planctomycetacia é a mais expressiva (54 % das ASVs de membros do filo), sendo no filo *Bacteroidetes* a classe *Bacteroidia* (88 %).

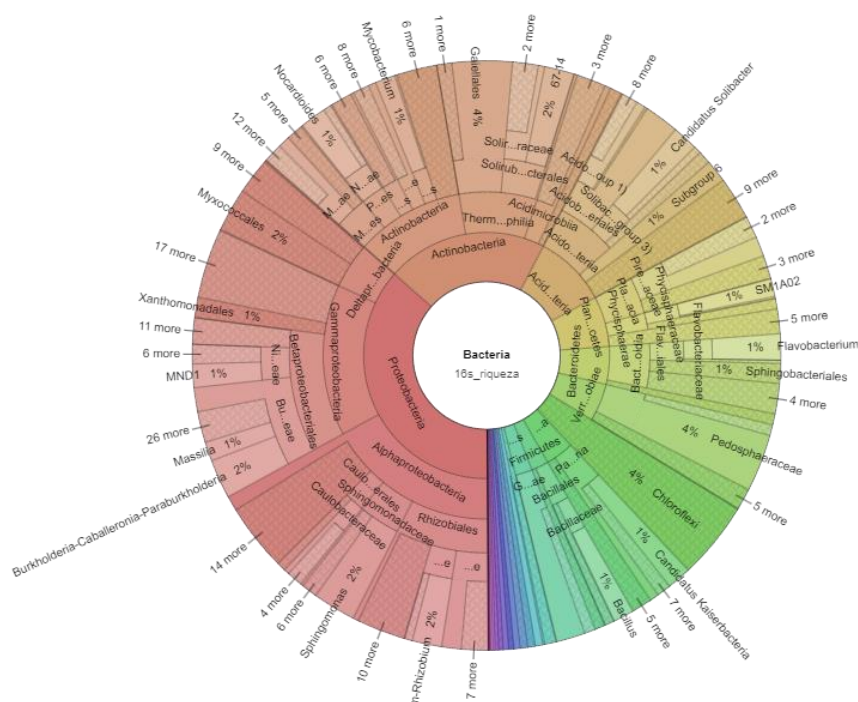


Figura 8: Riqueza das bactérias isoladas do solo agrícola com incorporação de EucaBio_sólido, considerando todas as amostras. Gráfico criado em *Krona* (Ondov *et al.*, 2011).

Em termos de abundância, a maioria das ASVs pertenceram ao filo *Proteobacteria* (58 % do número de sequências analisadas), sendo as restantes pertencentes aos filios *Actinobacteria* (13 %), *Acidobacteria* (9 %) e *Bacteroidetes* (4 %) (Figura 9). Uma estrutura semelhante das comunidades bacterianas foi descrita em solos agrícolas (Lee *et al.*, 2020), solos de cultura de milho (Peiffer *et al.*, 2013) e de cultura de soja (Mendes *et al.*, 2014). O filo *Proteobacteria* é dominado pelas classes *Gammaproteobacteria* (63 % das sequências de *Proteobacteria*), *Alphaproteobacteria* (33 %) e *Deltaproteobacteria* (4 %). O filo *Actinobacteria* é representado maioritariamente pela classe *Actinobacteriia* (57 % das sequências do filo), assim como o filo *Acidobacteria* pela classe *Acidobacteria* (78 %) e, por fim o filo *Bacteroidetes* pela classe *Bacteroidia* (91 %). Os resultados revelam assim que o filo *Proteobacteria* é o mais rico e abundante na comunidade bacteriana presente nas amostras de solo, sendo as classes *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* as mais representativas em termos de riqueza e abundância. A prevalência deste filo vai de acordo com estudos realizados em diversos tipos de

solos, entre eles solo agrícola e solo florestal (Lladó *et al.*, 2017). Importa ainda destacar a dominância de membros da família *Burkholderiaceae*.

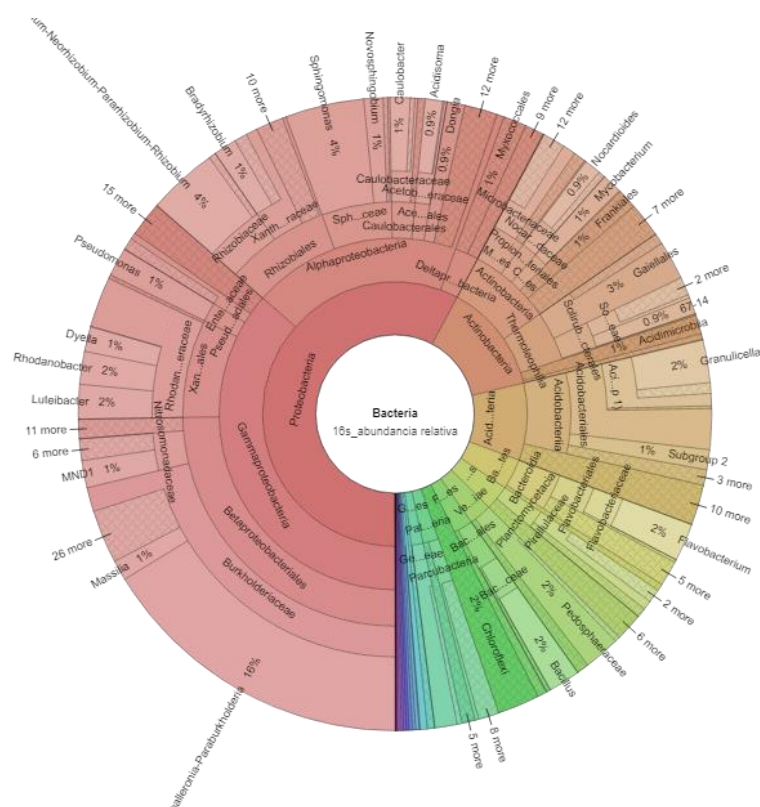


Figura 9: Abundância relativa das bactérias isoladas do solo agrícola com incorporação de EucaBio_sólido, considerando todas as amostras. Gráfico criado em *Krona* (Ondov *et al.*, 2011).

A abundância relativa de cada filo e família foi comparada nas comunidades bacterianas, provenientes de amostras com diferentes concentrações de EucaBio_sólido e tempos de amostragem (Figura 10). A abundância de bactérias pertencentes ao filo dominante *Proteobacteria* aumenta com a concentração do bio-herbicida. Nas amostras de solo sem bio-herbicida, a abundância de *Proteobacteria* é aproximadamente 40 %. É verificado um aumento para 54 %, 64 % e 73 % com o aumento de 2,5 %, 5 % e 10 % de EucaBio_sólido, respetivamente. O aumento da abundância relativa deste filo com o aumento da concentração de bio-herbicida vai de acordo com vários estudos realizados com herbicidas sintéticos (Liu *et al.*, 2020; Pertile *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Pertile *et al.* (2021) indica que este aumento é devido à potencial capacidade dos membros deste filo metabolizarem os herbicidas sintéticos. Esta pode ser também uma hipótese para explicar o aumento de *Proteobacteria* com o aumento da concentração de EucaBio. Os filios *Acidobacteria* e *Actinobacteria* alternam entre os segundos e terceiros filios mais abundantes. Enquanto que o filo *Acidobacteria* não apresenta uma alteração significativa com o aumento da concentração do bio-herbicida, o filo *Actinobacteria* apresenta uma diminuição da sua abundância

com o aumento da concentração de EucaBio_sólido. O mesmo acontece com os filos *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Patescibacteria* entre outros.

Em relação à abundância relativa das famílias (Figura 10 (B)), verifica-se que a família *Burkholderiaceae* (*Proteobacteria*) vai aumentando com as diferentes concentrações do bio-herbicida. Na ausência de EucaBio_sólido (controle), a abundância relativa de *Burkholderiaceae* é aproximadamente 6,5 %, mas esta aumenta com a concentração de bio-herbicida (18,5 %, 26,3 % e 33,7 % nas concentrações de 2,5 %, 5 % e 10 % de EucaBio_sólido, respetivamente). Já a condição “tempo” apresenta o efeito contrário nas concentrações 5 % e 10 %, no qual a sua abundância em T0 é 28,0 % e 41,0 %, em T1 é 27,5 % e 31,7 % e em T2 é 23,4% e 28,5%. A família *Burkholderiaceae* é caracterizada pela presença de organismos ecologicamente diversos e contém organismos saprófitos, fitopatógenos, patógenos oportunistas, bem como patógenos primários para humanos e animais (Coenye, 2014). O género mais proeminente dentro desta família, é o género *Burkholderia*, caracterizado pelas suas propriedades biorremediadoras e biopesticidas, pela capacidade de sintetizar uma ampla gama de compostos antimicrobianos e, para além disso é capaz de fixar nitrogénio, formar nódulos radiculares e pode atuar como patógenos de plantas (Coenye, 2014; Depoorter *et al.*, 2016). Outro género importante é o género *Pseudomonas*, que desempenha um papel fundamental no solo para promoção do crescimento das plantas e no controlo de patógenos (Sah & Singh, 2016). Este também possui membros que são patógenos de plantas, insetos e humanos (Silby *et al.*, 2011). Esta família exerce um papel importante na biologia do solo, nas relações planta-microorganismo e na saúde humana, e pode ser benéfica ou prejudicial, dependendo da espécie e do contexto em que se encontra. O mesmo efeito é observado para a família *Rhodonobacteraceae* (*Proteobacteria*), que também se apresenta mais abundante nas concentrações mais elevadas de EucaBio_sólido, sendo aproximadamente 0,3 % no controlo, 3,4 %, 8,5 % e 17 % nas concentrações de 2,5 %, 5 % e 10 % de EucaBio_sólido, respetivamente. Esta família é caracterizada por estar profundamente envolvida no ciclo biogeoquímico do enxofre e do carbono e na simbiose com micro e macrorganismos aquáticos (Pujalte *et al.*, 2014). Encontra-se ainda envolvida no ciclo de nitrogénio, promovendo assim o crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogénio, que é essencial para o desenvolvimento das plantas (Hirsch & Mauchline, 2015; Li *et al.*, 2018). Apesar de não ser tão evidente, outras famílias são igualmente afetadas positivamente pela maior concentração de EucaBio_sólido, como é o caso de *Acidobacteriaceae* (*Subgroup I*) (*Acidobacteria*) e *Rhizobiaceae* (*Proteobacteria*). Em contraste, as famílias *Pedospaeraceae* (*Verrucomicrobia*) e *Xanthobacteraceae* (*Proteobacteria*) são afetadas negativamente pelo bio-herbicida, uma vez que a sua abundância diminui com as

concentrações crescentes de herbicida. Na ausência de bio-herbicida (controlo), a família *Pedospaeraceae* apresenta aproximadamente 5,2 % de abundância, valor esse que diminui para 1,8 %, 0,9 % e 0,6 %, com as concentrações de 2,5 %, 5 % e 10 % de bio-herbicida, respetivamente. Já a abundância da família *Xanthobacteraceae* reduz 3,8 %, 2,8 %, 2 % e 1,1 %, nas mesmas amostras, respetivamente. A família *Xanthobacteraceae*, possui o género *Azorhizobium* que consiste inteiramente em simbioses fixadores de nitrogénio que vivem em associação com plantas leguminosas (Oren, 2014). Esta diminuição indica um potencial efeito negativo da aplicação de EucaBio_sólido na sua maior concentração (10 %) no desenvolvimento das espécies agrícolas.

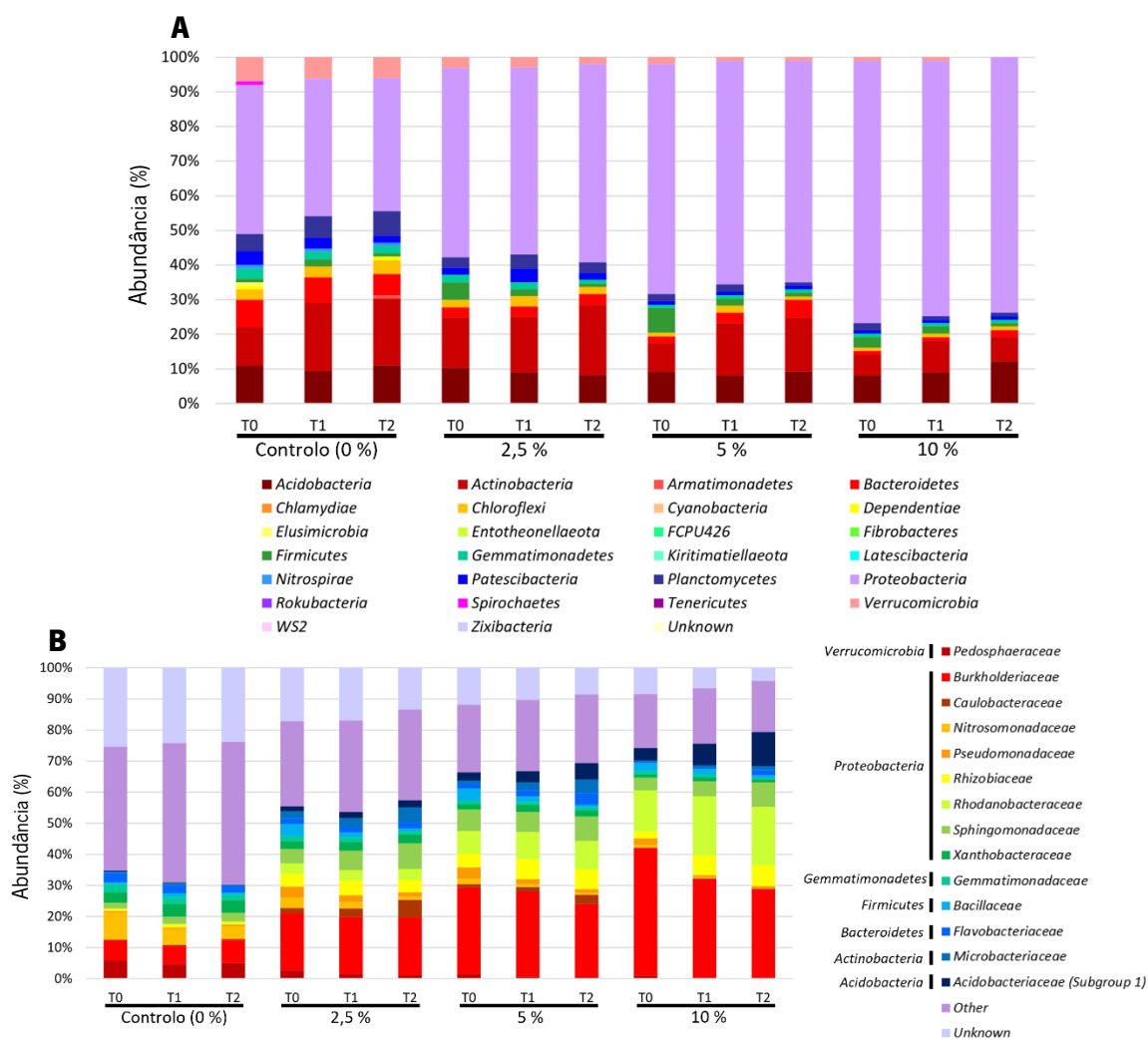


Figura 10: Abundâncias relativas dos filos bacterianos (A) e das principais famílias bacterianas (B) reveladas pela sequenciação do amplicão *16S* das amostras de solo em diferentes condições. São representadas também os filos a que pertencem cada família. *Other* - restantes famílias presentes em menor percentagem. Gráficos criados no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018).

3.3.2. Comunidade fúngica

Assim como para a comunidade bacteriana, a diversidade da comunidade fúngica foi comparada entre as amostras de solo com diferentes concentrações de EucaBio_sólido, através da preparação de curvas de rarefação e determinação de índices de diversidade, ambos normalizados para o número mínimo de sequências em todas as amostras ($n = 14.002$).

Tal como verificado para as comunidades bacterianas, as curvas de rarefação aparentam atingir *plateau* (Figura 11), principalmente no caso das comunidades fúngicas provenientes das amostras com maior concentração de EucaBio_sólido, indicando que o esforço de amostragem foi suficiente para representar estas comunidade. Já as curvas das condições com menor percentagem de bio-herbicida, não aparentam estar a atingir *plateau* demonstrando que a profundidade da amostragem deveria ter sido maior para ter uma boa representação da comunidade fúngica. As curvas de rarefação também indicam uma diferença na riqueza entre as condições, ocorrendo uma redução da riqueza com o aumento da concentração de EucaBio_sólido.

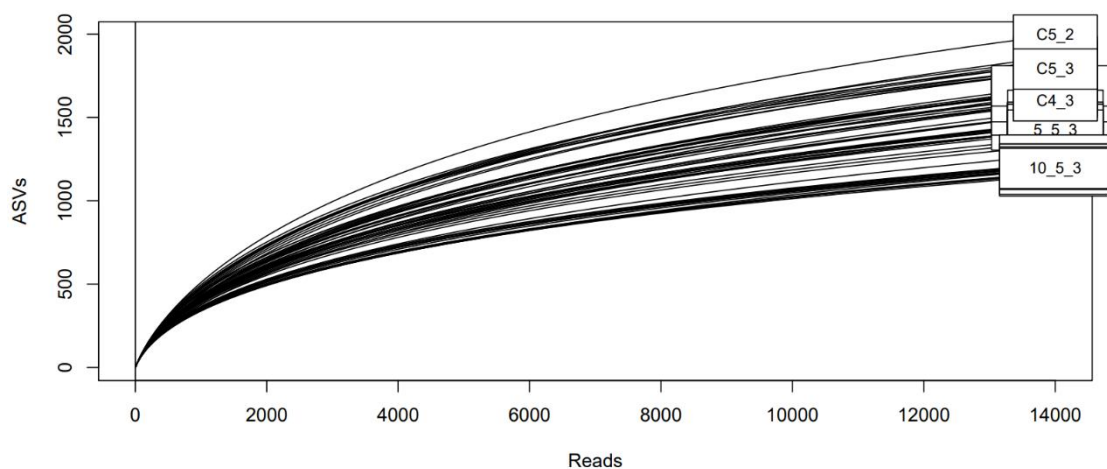


Figura 11: Curvas de rarefação da comunidade fúngica obtidas por sequências da região *ITS* do *rRNA* das amostras de solo com diferentes concentrações de EucaBio_sólido.

A variação na diversidade da comunidade fúngica foi feita pela determinação dos parâmetros de diversidade (Figura 12), que se alteram significativamente nas comunidades presentes nas amostras de solo agrícola. A riqueza (S) e a diversidade ($1-D$ e H) são superiores para o controlo e vão diminuindo com o aumento da concentração de EucaBio_sólido. Esta diminuição é concordante com estudos que avaliaram atividade antifúngica de diferentes concentrações de óleos essenciais de eucalipto (Kouki *et al.*, 2023; Ayed *et al.*, 2023). Uma diminuição da riqueza e diversidade das comunidades fúngicas foi também observada em estudos

realizados com herbicidas sintéticos (Wang *et al.*, 2022; Bhardwaj *et al.*, 2024). Entre as diferentes condições existentes neste trabalho, concentração e tempo, esta análise indica que a concentração é o fator com maior impacto na riqueza e diversidade fúngica. A variação temporal apresenta um impacto menor, sendo ainda assim possível observar uma redução da diversidade ao longo do tempo em alguns casos (Figura 12).

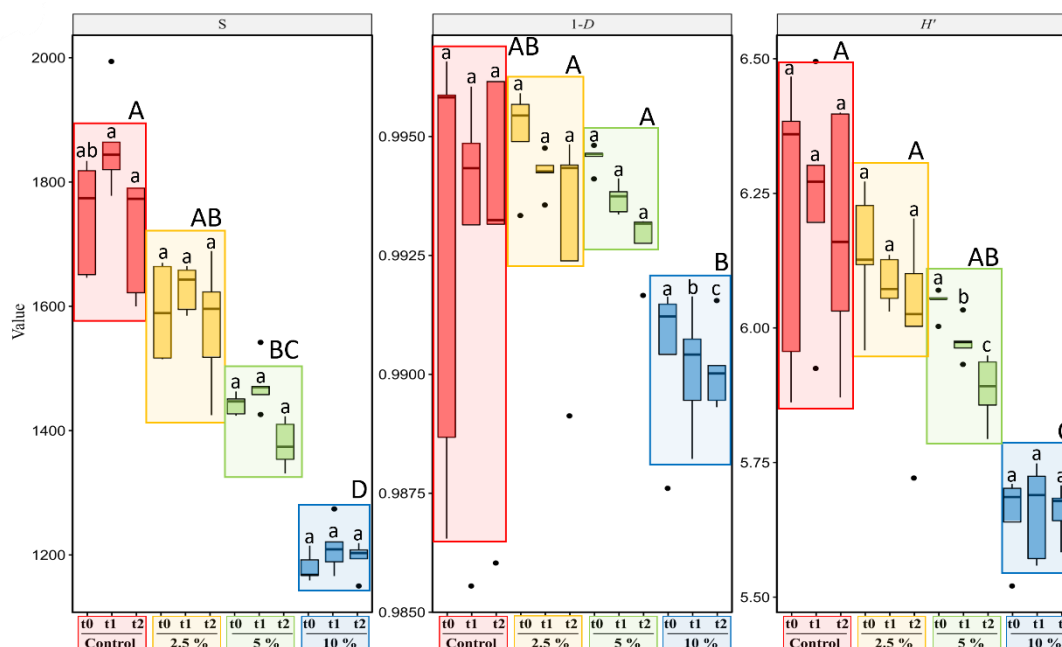


Figura 12: Diversidade da comunidade fúngica encontrada nas amostras de solos. *S*: riqueza microbiana, *1-D*: índice de Gini-Simpson e *H'*: índice de Shannon. Diferentes letras significam diferenças estatisticamente significativas, onde as letras maiúsculas (A - D) se referem à diferença entre concentrações e as minúsculas (a - c) entre os tempos de cada concentração (Anexo 2).

A comunidade fúngica total é composta por ASVs que são referentes a 27 filos, 74 classes, 142 ordens, 196 famílias, 337 géneros e 33 espécies. É importante referir que muitos ASVs não foram classificados até aos níveis taxonómicos mais específicos. Nas comunidades fúngicas analisadas, os filos que apresentam maior riqueza são Ascomycota (68 % das ASVs), Basidiomycota (12 %), Glomeromycota (8 %), Mortierellomycota (5 %), Mucoromycota (4 %) (Figura 13). Dentro do filo Ascomycota, o maior número de ASVs é encontrado na classe Sordariomycetes (43 % das ASVs) e Eurotiomycetes (27 %), seguida de Dothideomycetes (20 %), Leotiomycetes (6 %) e Saccharomycetes (2 %). O filo Basidiomycota é representado por Agaricomycetes (40 % das ASVs), Tremellomycetes (40 %), Atractiellomycetes (13 %) e Microbotryomycetes (6 %). O filo Glomeromycota é representado em grande parte pela classe Glomeromycetes (63 %), enquanto Mortierellomycota é representado pela classe Mortierellomycetes (100 %) e Mucoromycota pela classe Mucoromycetes (81 %).

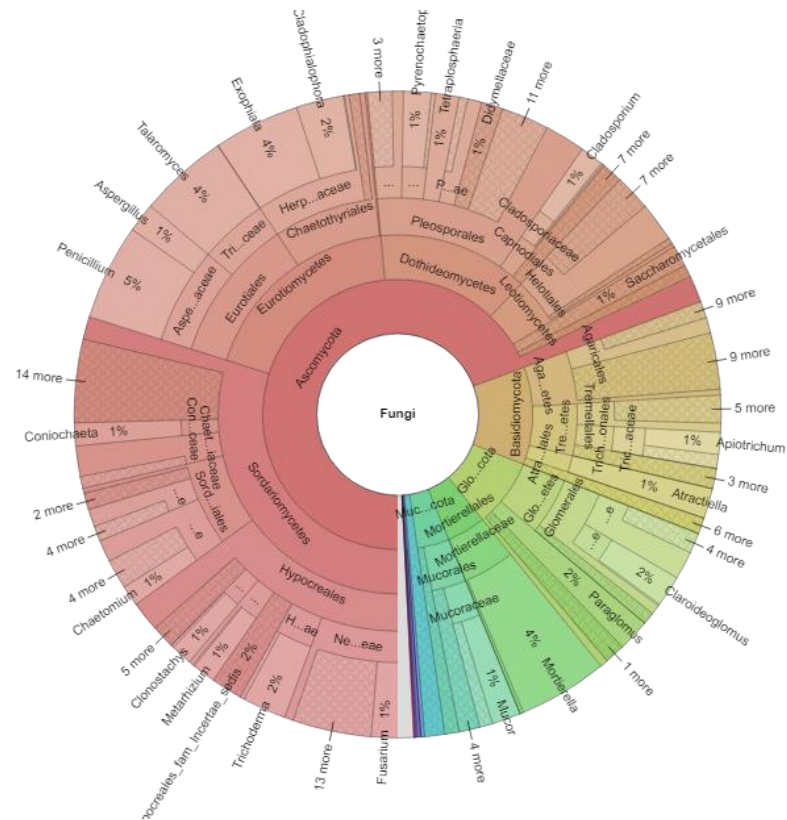


Figura 13: Riqueza dos fungos isolados do solo, considerando todas as amostras. Gráfico criado em Krona (Ondov *et al.*, 2011).

A abundância relativa revelou que o filo mais abundante é Ascomycota (58 % do número de sequências analisadas), seguido de Basidiomycota (27 %), Mortierellomycota (7 %), Mucoromycota (4 %) e Glomeromycota (3 %) (Figura 14). As classes Sordariomycetes (46 % das sequências), Eurotiomycetes (28 %) e Dothideomycetes (14 %) são as mais abundantes no filo Ascomycota. No que diz respeito ao filo Basidiomycota, as classes Tremellomycetes (46 % das sequências) e Atractiellomycetes (25 %) são as mais representativas.

No geral, o filo Ascomycota apresentou maior riqueza e abundância relativa na comunidade fúngica presente nas amostras de solo, seguindo-se pelo filo Basidiomycota. A predominância destes filios no solo está de acordo com estudos anteriores sobre o solo (Lim *et al.*, 2010; Fierer, 2017), incluindo solos agrícolas (Choudhary *et al.*, 2022). As classes Sordariomycetes e Eurotiomycetes são as mais ricas e abundantes.

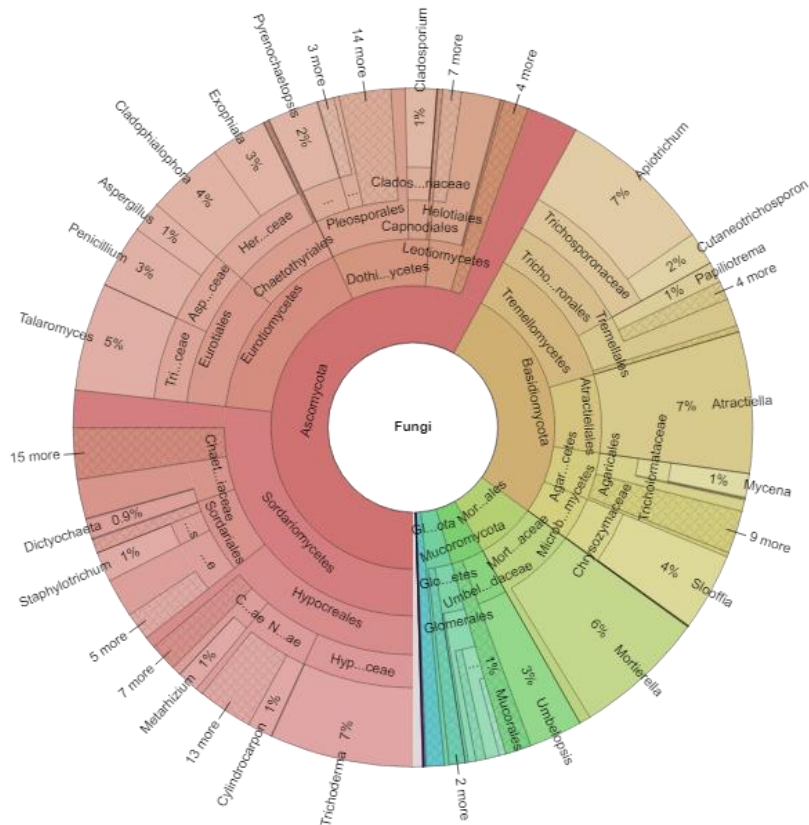


Figura 14: Abundância relativa dos fungos isolados do solo, considerando todas as amostras. Gráfico criado em Krona (Ondov *et al.*, 2011).

As abundâncias relativas de cada filo e família foi comparada nas comunidades fúngicas entre as diferentes condições experimentais (Figura 15). É possível observar que os filios mais abundantes em todas as condições são Ascomycota e Basidiomycota, e ambos apresentam um ligeiro aumento entre o controlo e as restantes condições. Isto é, no controlo têm aproximadamente 44 % (Ascomycota) e 15 % (Basidiomycota) de abundância relativa, enquanto que nas condições 2,5 %, 5 % e 10 % têm aproximadamente 62 %/30 %, 61 %/31 % e 59 %/32 % (Ascomycota/Basidiomycota), respetivamente. Alguns estudos sobre o impacto de herbicidas no microbioma demonstram efeitos semelhantes nos dois filios anteriormente referidos (Wang *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2023). Outro filo que se torna mais abundante é Mucoromycota, que tinha uma abundância relativa muito reduzida no controlo (aproximadamente 0,5 %) e aumenta para aproximadamente 3 %, 5 % e 7 % nas concentrações 2,5 %, 5 % e 10 %, respetivamente. Os filios Chytridiomycota, Glomeromycota e Mortierellomycota revelam ser afetados negativamente pelo bio-herbicida, sendo isto demonstrado pela diminuição da sua abundância com o aumento da concentração do EucaBio_sólido.

Uma análise semelhante foi realizada quanto à abundância relativa das famílias presente nas amostras de solo (Figura 15(B)). As famílias Aspergillaceae (Ascomycota), Trichocomaceae

(Ascomycota) e Trichosporonaceae (Basidiomycota) são afetadas positivamente pelo bio-herbicida (aumento da abundância relativa com o aumento de EucaBio_sólido), apresentando abundâncias respectivas de aproximadamente 0,7 %, 0,5 % e 0,1 % para o controle; 3,93 %, 3,4 % e 7 % para a concentração 2,5 %; 6,3 %, 5,7 % e 11 % para a concentração 5 % e por fim 6,9 %, 11 % e 17 % para a concentração 10 %. A família Aspergillaceae possui vários gêneros, sendo o mais estudado *Aspergillus* que possui membros caracterizados saprófitos, endófitos assintomáticos e fitopatógenos oportunistas (Nji *et al.*, 2023). Algumas espécies de *Aspergillus* podem ser ocasionalmente prejudiciais aos humanos (Mousavi *et al.*, 2016). Outro gênero que têm recebido atenção significativa é *Penicillium* devido à sua capacidade de produção de compostos bioativos, incluindo micotoxinas, antibióticos, herbicidas, antioxidantes, inseticidas e compostos anticancerígenos (Frisvad & Samson, 2004). Este apresenta ainda algumas espécies que promovem o crescimento das plantas por vários mecanismos, como a produção de fito-hormonas, solubilização de minerais e antagonismo a fitopatógenos (Babu *et al.*, 2015). Por outro lado, as famílias Chaetomiaceae (Ascomycota) e Mortierellaceae (Mortierellomycota) são afetadas negativamente, isto é, a sua abundância vai diminuindo nas amostras com maior concentração de EucaBio_sólido. Chaetomiaceae apresenta abundâncias aproximadas de 4,8 % (controle), 3,8 % (2,5 %), 2,6 % (5 %) e 1,5 % (10 %). A família Mortierellaceae apresenta a maior variação de abundância, passando de mais abundante, com aproximadamente 21,5 % (controle), para aproximadamente 4 % (2,5 %), 1,6 % (5 %) e 0,2 % (10 %). O gênero *Mortierella*, pertencente a família Mortierellaceae, compreende espécies que ocorrem em solos agrícolas e têm funções de promoção do crescimento das plantas (Ozimek & Hanaka, 2021) e capacidade de produzir ácidos orgânicos com propriedades antifúngicas e antibacterianas (Shemshura *et al.*, 2018).

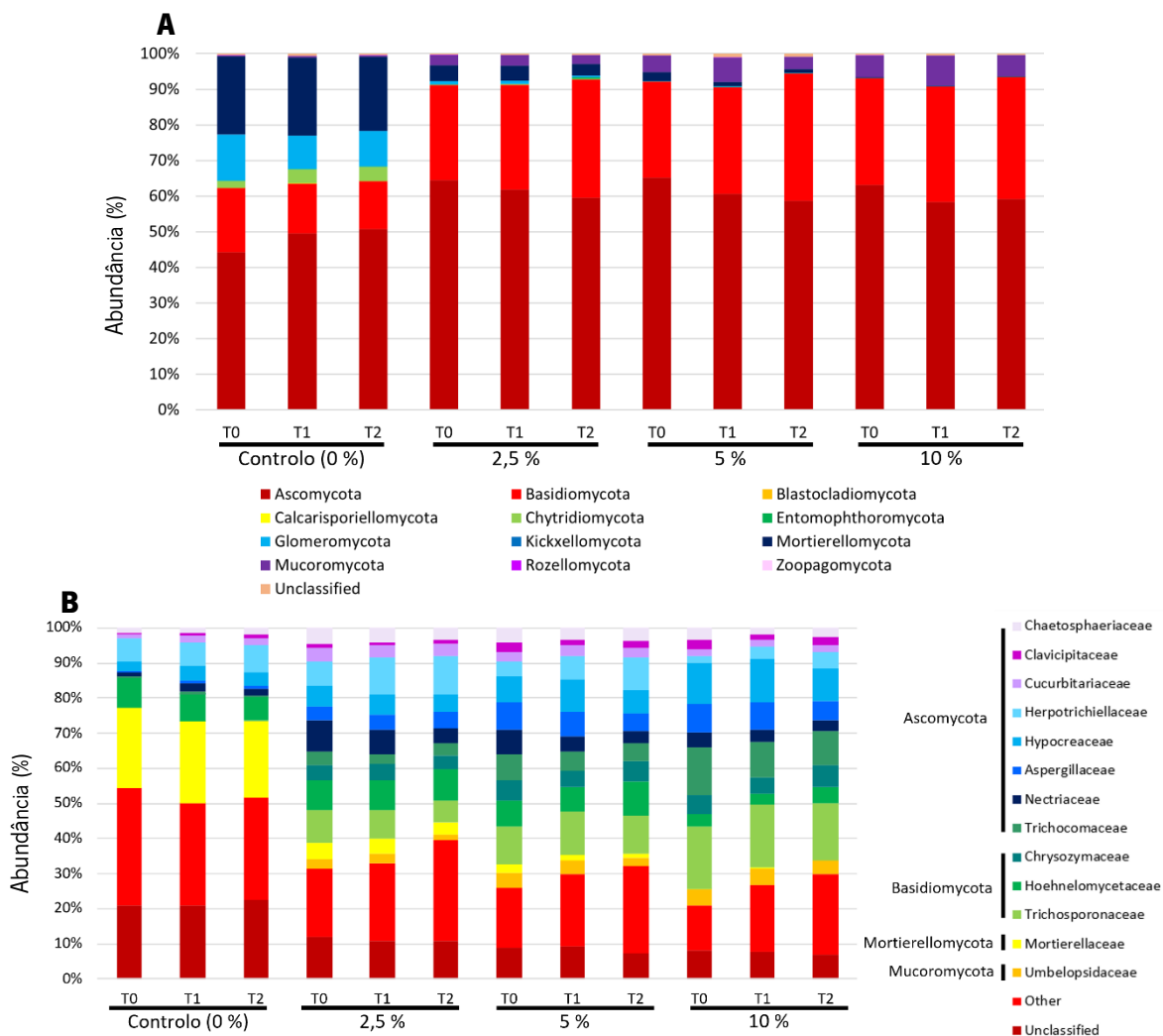


Figura 15: Abundâncias relativas dos filos fúngicos (A) e das principais famílias fúngicas (B) reveladas pela sequenciação de amplicões das amostras de solo das diferentes condições. São representados os filos correspondentes as famílias. *Other* restantes famílias presentes em menor percentagem. Gráficos criados no *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, 2018).

3.3.3. Comparação das comunidades bacterias e fúngicas

Através de uma análise multivariada da escala multidimensional não métrica (NMDS) foram avaliadas as diferenças na composição das comunidades de bactérias e fungos (Figura 16). Esta análise foi feita com base no índice de similaridade de Jaccard, que tem em consideração a presença ou ausência de espécies. Esta análise mostrou uma boa representação da distribuição das comunidades microbianas (2D stress < 0.2). As comunidades bacterianas e fúngicas agruparam-se de acordo com a concentração do bio-herbicida, demonstrando assim uma maior similaridade na estrutura da comunidade das amostras com a mesma concentração. Analisando as comunidades microbianas, o controlo apresenta-se mais disperso das restantes amostras, o que indica comunidades mais distintas em comparação com as outras condições. Este resultado foi corroborado pelo teste *ANOSIM*, que mostrou que as diferentes concentrações apresentam maior dissimilaridade entre si do que nas comunidades obtidas com a mesma concentração de

EucaBio_sólido (bactérias: $R=0,887$, $p=0,001$; fungos: $R=0,785$, $p=0,001$). Importante referir que, pelo mesmo teste estatístico, , no caso das bactérias, a combinação dos dois fatores (concentração e tempo) apresentam dissimilaridade semelhante à concentração (bactérias: $R=0,890$, $p=0,001$; fungos: $R=0,757$, $p=0,001$). Por outro lado, o fator tempo apresenta uma menor dissimilaridade (bactérias: $R=0,0983$, $p=0,006$; fungos: $R=0,0615$, $p=0,014$). A análise de PERMANOVA mostrou que tanto a concentração como o tempo de amostragem têm impacto significativo na diversidade das comunidades de bactérias e fungos ($Pr(>F) < 0.001$). A concentração relevou ser o fator com maior relevância em ambas as comunidades (bactéria $R^2=0,18479$; fungo $R^2=0,27198$), enquanto que o tempo de amostragem apresentou uma contribuição menor (bactéria $R^2=0,0622$; fungo $R^2=0,04602$). Além disso, os resultados da PERMANOVA mostraram que a distribuição das comunidades também foi influenciada significativamente pela interação dos dois fatores (concentração x tempo) (bactéria $R^2=0,23889$; fungo $R^2=0,247$).

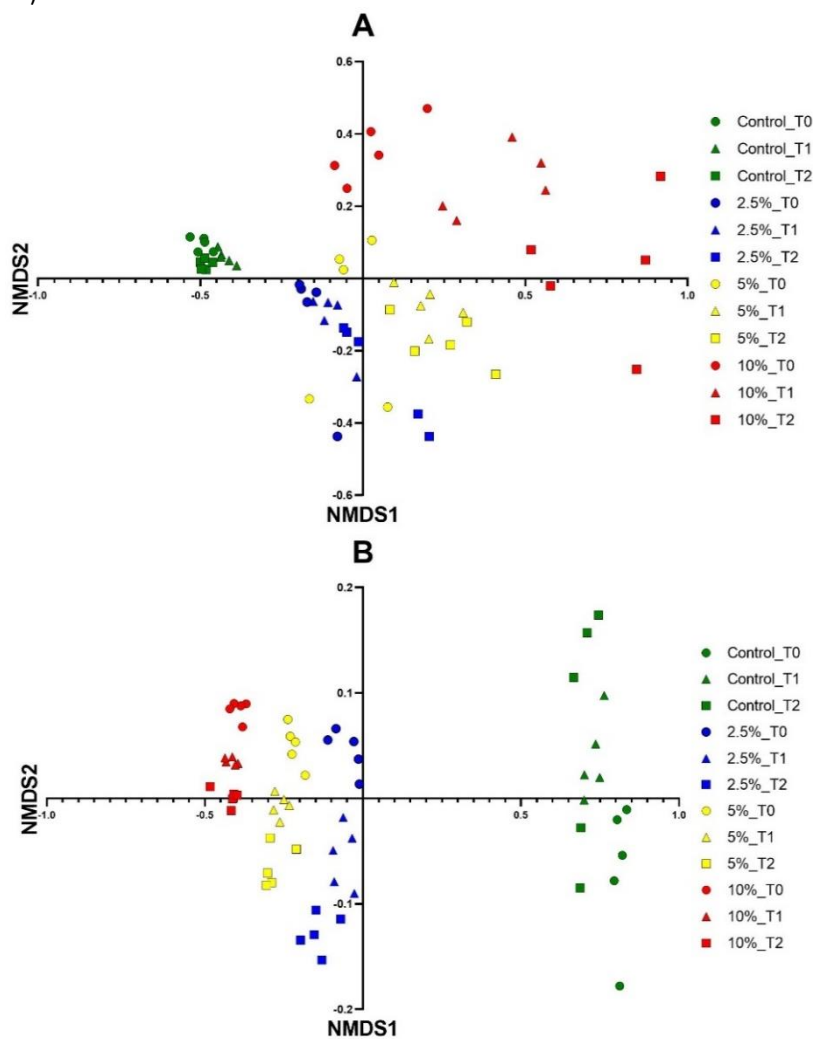


Figura 16: Análise multivariada da escala multidimensional não métrica (NMDS) das comunidades de bactérias (A) e de fungos (B), pelo coeficiente de Jaccard (bactéria 2D Stress = 0,12; fungo 2D Stress = 0,05).

4. Conclusão

Neste trabalho foi avaliado o impacto da aplicação do bio-herbicida EucaBio_sólido nas comunidades bacterianas e fúngicas de solo agrícola. Existem vários estudos que descrevem as alterações nas comunidades microbianas do solo depois da aplicação de herbicidas sintéticos (Moretto *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Pertile *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Bhardwaj *et al.*, 2024). Contudo, até onde tenho conhecimento, poucos são os que avaliam estas alterações após aplicação de bio-herbicidas (Romdhane *et al.*, 2016). A diversidade e riqueza das comunidades microbianas estudadas é maior na condição controle (sem aplicação de EucaBio_sólido) e vai diminuindo com o progressivo aumento da concentração de bio-herbicida. Esta tendência é também verificada em grupos taxonômicos específicos (no caso das comunidade bacteriana: *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* e no caso das comunidades fúngica: *Glomeromycota* e *Mortierellomycota*), demonstrando que o impacto do bio-herbicida é tanto maior quanto maior a concentração do mesmo. Estes resultados foram corroborados pelo NMDS e análise estatística (ANOSIM e PERMANOVA) que demonstraram que a concentração é o fator que tem maior impacto na distribuição das comunidades, quando comparado com o tempo de amostragem das comunidades microbianas do solo. Este trabalho contribuiu para uma melhor compreensão do impacto deste bio-herbicida nas comunidades não alvo dos solos agrícolas. Assim, é recomendado que a aplicação do bio-herbicida seja realizada a concentrações menores (5 % ou inferior) para minimizar o impacto nas comunidades microbianas, uma vez que também não foram encontradas alterações no desenvolvimento das plantas nestas mesmas concentrações (Pinto *et al.*, 2023).

5. Referências

Abou El-Ghit, H. M. (2016). Potent physiological allelopathic effect of *Eucalyptus* leaf extract on *Malva parviflora* L (mallow) weed. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3, 584-591.

Águas ASNdC (2019). *Eucalyptus globulus* Labill. regeneration from seeds in Portugal 's mainland. Instituto Superior de Agronomia, ISA/UL

Aislabie, J., Deslippe, J. R., & Dymond, J. (2013). Soil microbes and their contribution to soil services. *Ecosystem services in New Zealand—conditions and trends*. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand, 1, 143-161.

Albanese, D., Fontana, P., De Filippo, C., Cavalieri, D., & Donati, C. (2015). MICCA: a complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. *Scientific reports*, 5, 9743.

Alves AM, Pereira JS, Silva JMN (2007) A introdução e a expansão do eucalipto em Portugal. In AM Alves, JS Pereira, JMN Silva, eds. O Eucalipto em Portugal: Impactes Ambientais e Investigação Científica, Lisboa: ISAPress, 13-26

Aragão, F. B., Palmieri, M. J., Ferreira, A., Costa, A. V., Queiroz, V. T., Pinheiro, P. F., & Andrade-Vieira, L. F. (2015). Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy J*, 35, 259-272.

Arie, T. (2019). Fusarium diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of pesticide science*, 44, 275-281.

Aronesty, E. (2011). ea-utils: Command-line tools for processing biological sequencing data.

Asai, S., Ayukawa, Y., Gan, P., & Shirasu, K. (2021). Draft Genome Resources for Brassicaceae Pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34, 1316-1319.

Ayed, A., Polito, F., Mighri, H., Souihi, M., Caputo, L., Hamrouni, L., ... & Mabrouk, Y. (2023). Chemical composition of essential oils from eight Tunisian *Eucalyptus* species and their antifungal and herbicidal activities. *Plants*, 12, 3068.

Babu, A. G., Kim, S. W., Yadav, D. R., Hyum, U., Adhikari, M., & Lee, Y. S. (2015). *Penicillium menonorum*: a novel fungus to promote growth and nutrient management in cucumber plants. *Mycobiology*, 43, 49-56.

Bailey, K. L. (2014). The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens. In *Integrated Pest Management* (245-266). Academic Press.

Balderrama-Carmona, A. P., Silva-Beltrán, N. P., Alvarez, L. A. Z., Bante, N. P. A., & Palacio, E. F. M. (2020). Consequences of herbicide use in rural environments and their effect on agricultural workers. In *Sustainability Concept In Developing Countries*. IntechOpen.

Basu and Rao, 2020. Environmental effects and management strategies of the herbicides. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 2020, 11, 518-535.

Bayle, G. (2019). Ecological and social impacts of *Eucalyptus* tree plantation on the environment. *Journal of Biodiversity Conservation and Bioresource Management*, 5, 93–104.

Bhardwaj, L., Reddy, B., Nath, A. J., & Dubey, S. K. (2024). Influence of herbicide on rhizospheric microbial communities and soil properties in irrigated tropical rice field. *Ecological Indicators*, 158, 111534.

Bodenhause, N., Horton, M. W., & Bergelson, J. (2013). Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 8.

Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation research*, 543, 251–272.

Booth TH (2012) Eucalypts and their potential for invasiveness particularly in frost-prone regions. *Int J For Res* 2012:1–7

Bowman, D. M., Balch, J. K., Artaxo, P., Bond, W. J., Carlson, J. M., Cochrane, M. A., ... & Pyne, S. J. (2009). Fire in the Earth system. *science*, 324, 481-484.

Branco M (2007) Agentes bióticos do eucalipto em Portugal. In AM Alves, JS Pereira, JMN Silva, eds. O Eucalipto em Portugal: Impactes Ambientais e Investigação Científica, Lisboa: ISAPress, 255-284

Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220, 1108-1115.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, 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., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335.

Carmona, S. L., Burbano-David, D., Gómez, M. R., Lopez, W., Ceballos, N., Castaño-Zapata, J., ... & Soto-Suárez, M. (2020). Characterization of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates associated with commercial tomato crops in the Andean region of Colombia. *Pathogens*, 9, 70.

Carrión, V. J., Cordovez, V., Tyc, O., Etalo, D. W., de Bruijn, I., de Jager, V. C., ... & Raaijmakers, J. M. (2018). Involvement of *Burkholderiaceae* and sulfurous volatiles in disease-suppressive soils. *The ISME journal*, 12, 2307-2321.

Catry FX, Moreira F, Deus E, Silva JS, Águas A (2015) Assessing the extent and the environmental drivers of *Eucalyptus globulus* wildling establishment in Portugal: results from a countrywide survey. *Biological Invasions* 17: 3163-3181

Catry FX, Moreira F, Tujeira R, Silva JS (2013) Post-fire survival and regeneration of *Eucalyptus globulus* in forest plantations in Portugal. *Forest Ecology and Management* 310: 194-203

Catry FX, Rego FC, Bugalho MN, Lopes T, Silva JS, Moreira JS, Moreira F. (2006). Effects of fire on tree survival and regeneration in a Mediterranean ecosystem. *Forest Ecology and Management - FOREST ECOL MANAGE*. 234, S197.

Cerasoli S, Caldeira M, Pereira J, Caudullo G, de Rigo D (2016) *Eucalyptus globulus* and other eucalypts in Europe: distribution, habitat, usage and threats, Luxembourg: Publishing Office of the EU: 90-91

Chao, A., Chiu, C. H., & Jost, L. (2014). Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity, and related similarity and differentiation measures through Hill numbers. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 45, 297-324.

Chelius, M. K., & Triplett, E. W. (2001). The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *MicrobialEcology*, 41, 252-263.

Choudhary, M., Jat, H. S., Jat, M. L., & Sharma, P. C. (2022). Climate-smart agricultural practices influence the fungal communities and soil properties under major agri-food systems. *Frontiers in Microbiology*, 13, 986519.

Clarke, K. R. & Madwick, R. M. (2015). Primer v7: User manual/ tutorial. Plymouth Marine Laboratory, UK: PRIMER-E-Ltd.

Coenye, T. (2014). The family *Burkholderiaceae*. The prokaryotes: *Alphaproteobacteria* and *betaproteobacteria*, 343, 759-776.

- Comeau, A. M., Douglas, G. M., & Langille, M. G. I. (2017). Microbiome helper: a custom and streamlined workflow for microbiome research. *MSystems*, 2(1).
- Costa, D., Fernandes, T., Martins, F., Pereira, J. A., Tavares, R. M., Santos, P. M., ... & Lino-Neto, T. (2021). *Illuminating Olea europaea* L. endophyte fungal community. *Microbiological Research*, 245, 126693.
- Costa, D., Tavares, R. M., Baptista, P., & Lino-Neto, T. (2020). Cork oak endophytic fungi as potential biocontrol agents against *Biscogniauxia mediterranea* and *Diplodia corticola*. *Journal of Fungi*, 6, 287
- Costa, D., Tavares, R. M., Baptista, P., & Lino-Neto, T. (2022). The influence of bioclimate on soil microbial communities of cork oak. *BMC microbiology*, 22, 163.
- Costa, P. S., Reis, M. P., Ávila, M. P., Leite, L. R., de Araújo, F. M., Salim, A. C., ... & Nascimento, A. M. (2015). Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. *PLoS One*, 10, e0119465.
- Dayan, F. E., Barker, A., Bough, R., Ortiz, M., Takano, H., & Duke, S. O. (2019). Herbicide mechanisms of action and resistance.
- De A, Bose R, Kumar A, Mozumdar S (eds) (2014) Worldwide pesticide use. In: Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles. Springer, Berlin, pp 5–6
- de Souza Barros, V. M., Pedrosa, J. L. F., Gonçalves, D. R., Medeiros, F. C. L. D., Carvalho, G. R., Gonçalves, A. H., & Teixeira, P. V. V. Q. (2021). Herbicides of biological origin: A review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 96, 288-296.
- Decaëns, T. (2010), Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography*, 19: 287-302.
- Denton, B., (2007). Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *MMG 445. Basic Biotechnol.* 3, 1-5.
- Depoorter, E., Bull, M. J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., & Mahenthalingam, E. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 5215-5229.
- Dhakad, A. K., Pandey, V. V., Beg, S., Rawat, J. M., & Singh, A. (2018). Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *Journal of the science of food and agriculture*, 98, 833–848.
- Dighton J. (2007). Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. In: Kubicek CP, Druzhinina IS (eds) *The Mycota IV Environmental and microbial relationships*, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 287-300
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant pathogenic fungi. *Microbiology spectrum*, 5, 5-1.
- Dominati, E., Patterson, M., & Mackay, A. (2010). A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological economics*, 69, 1858-1868.
- dos Santos P, Matias H, Deus E, Águas A, Silva JS (2015) Fire effects on capsules and encapsulated seeds from *Eucalyptus globulus* in Portugal. *Plant Ecology* 216: 1611-1621

Duke SO (1988) Polycyclic alkanolic acids. In: Herbicides Chemistry, Degradation and Mode of Action, Vol. 3 (eds PC Kearney & DD Kaufman), 71–116. Marcel Dekker, New York, USA

Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64, 319-325.

Duke, S.O. and Dayan, F.E. (2018) *Herbicides*. John Wiley & Sons, Chichester.

Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10, 996-998.

Ezequiel, J., Valente, C., Ferreira, D., Marques, C., Monteiro, R., Alarico, L., ... & Máguas, C. A Regeneração natural do eucalipto em Portugal-desafios e constrangimentos. Título: as plantações de eucalipto e os recursos naturais em portugal: avanços recentes e desafios, 133.

Fabião A, Carneiro M, Lousã M, Madeira M (2007) Os impactes do eucaliptal na biodiversidade da vegetação sob coberto. In AM Alves, JS Pereira, JMN Silva, eds. *O Eucaliptal em Portugal: Impactes Ambientais e Investigação Científica*, Lisboa: ISAPress, 177-208

Fairman, Thomas A.; Nitschke, Craig R.; Bennett, Lauren T. (2015). Too much, too soon? A review of the effects of increasing wildfire frequency on tree mortality and regeneration in temperate eucalypt forests. *International Journal of Wildland Fire*.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO, (2022) *The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable*. Rome, FAO.

Fernandes, P. A. T. (2016). Natural regeneration and expansion capacity of forestry species: *Pinus pinaster* and *Eucalyptus globulus* (Doctoral dissertation, Universidade de Lisboa (Portugal)).

Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 579-590.

Flannigan M, Cantin AS, de Groot WJ, Wotton M, Newbery A, Gowman LM (2013) Global wildland fire season severity in the 21st century. *Forest Ecology and Management* 294: 54-61

Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in mycology*, 49, 1-174.

Guerrero, F., Carmona, C., Hernández, C., Toledo, M., Arriagada, A., Espinoza, L., Bergmann, J., Taborga, L., Yañez, K., Carrasco, Y., & Muñoz, A. A. (2022). Drivers of Flammability of *Eucalyptus globulus* Labill Leaves: Terpenes, Essential Oils, and Moisture Content. *Forests*, 13, 908.

He, Y., Pantigoso, H. A., Wu, Z., & Vivanco, J. M. (2019). Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *Journal of applied microbiology*, 127, 196-207.

Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in plant science*, 17, 569-574.

Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2015). The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. *Advances in applied microbiology*, 93, 45-71.

- Hughes, J. B., & Bohannon, B. J. (2004). Section 7 update: application of ecological diversity statistics in microbial ecology. In *Molecular microbial ecology manual*.
- Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., & Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4, 10–20.
- Ibáñez Jaime, M. D., & Blázquez Ferrer, M. A. (2018). Post-emergent herbicidal activity of *Eucalyptus globulus* Labill. essential oil. *Nereis*, 10, 25-36.
- ICNF, 2019. IFN6 – Principais resultados – relatório sumário, 34 pp, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Lisboa.
- Illumina. (2013). 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. Illumina Technical Document.
- Jha, C. K., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *J. Agric. Res. Dev*, 5, 108-119.
- Johnson, N. C., & Gehring, C. A. (2007). Mycorrhizas: symbiotic mediators of rhizosphere and ecosystem processes. In *The Rhizosphere* (pp. 73-100). Academic Press.
- Joshi NA, Fass JN (2011) Sickle: a sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33).
- Kalabokidis K, & Palaiologou P. 2019. Mediterranean Forest Fuels. *Encyclopedia of Wildfires and Wildland-Urban Interface (WUI) Fires*; Manzello, SL, Ed, 1-13.
- Kannan, V. R., Bastas, K. K., & Devi, R. S. (2015). 20 Scientific and Economic Impact of Plant Pathogenic Bacteria. *Sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria*, 369.
- Kassambara A (2023). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.6.0.
- Keeley J (2012) Fire in Mediterranean ecosystems- a comparative overview. *Israel Journal of Ecology and Evolution* 58: 123-135
- Khatoon, Z., Huang, S., Rafique, M., Fakhar, A., Kamran, M. A., & Santoyo, G. (2020). Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. *Journal of environmental management*, 273, 111118.
- Köljalg, U., Nilsson, H. R., Schigel, D., Tedersoo, L., Larsson, K. H., May, T. W., ... & Abarenkov, K. (2020). The taxon hypothesis paradigm—On the unambiguous detection and communication of taxa. *Microorganisms*, 8, 1910.
- Kouki, H., Amri, I., Souihi, M., Pieracci, Y., Trabelsi, I., Hamrouni, L., ... & Mabrouk, Y. (2023). Chemical composition, antioxidant, herbicidal and antifungal activities of leaf essential oils from three Tunisian *Eucalyptus* species. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130, 1411-1422.
- Kudsk, P. and Streibig, J.C. (2003), Herbicides – a two-edged sword. *Weed Research*, 43: 90-102.
- Latha, P. C., & Gopal, H. (2010). Effect of herbicides on soil microorganisms. *Indian Journal of Weed Science*, 42, 217-222.

Lear, G., Dickie, I., Banks, J., Boyer, S., Buckley, H. L., Buckley, T. R., ... & Holdaway, R. (2018). Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology*, 42, 10-50A.

Lee, S. A., Kim, J. M., Kim, Y., Joa, J. H., Kang, S. S., Ahn, J. H., ... & Weon, H. Y. (2020). Different types of agricultural land use drive distinct soil bacterial communities. *Scientific Reports*, 10, 17418.

Lahti, L., Shetty, S., Blake, T., & Salojarvi, J. (2017). Tools for microbiome analysis in R. *Version*, 1, 28.

Li, Y., Tang, K., Zhang, L., Zhao, Z., Xie, X., Chen, C. T. A., ... & Zhang, Y. (2018). Coupled carbon, sulfur, and nitrogen cycles mediated by microorganisms in the water column of a shallow-water hydrothermal ecosystem. *Frontiers in microbiology*, 9, 2718.

Lim, Y. W., Kim, B. K., Kim, C., Jung, H. S., Kim, B. S., Lee, J. H., & Chun, J. (2010). Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *The Journal of Microbiology*, 48, 284-289.

Liu, W., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Xu, N., Qu, Q., ... & Qian, H. (2020). Enantioselective effects of imazethapyr on *Arabidopsis thaliana* root exudates and rhizosphere microbes. *Science of The Total Environment*, 716, 137121.

Liu, Y., Stanturf, J., Goodrick, S. (2010). Trends in global wildfire potential in a changing climate. *Forest Ecol. Manage.* 259, 686–697

Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2017). Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81, e00063-16.

Lyons, R., Stiller, J., Powell, J., Rusu, A., Manners, J. M., & Kazan, K. (2015). *Fusarium oxysporum* triggers tissue-specific transcriptional reprogramming in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one*, 10, e0121902.

Ma, Q., Li, Q., Wang, J., Parales, R. E., Li, L., & Ruan, Z. (2023). Exposure to three herbicide mixtures influenced maize root-associated microbial community structure, function and the network complexity. *Environmental Pollution*, 336, 122393.

Magurran, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princeton university press.

Maharjan, S., Shrestha, B. B., & Jha, P. K. (2007). Allelopathic effects of aqueous extract of leaves of *Parthenium hysterophorus* L. on seed germination and seedling growth of some cultivated and wild herbaceous species. *Scientific World*, 5, 33-39.

Maksymiv, I. (2015). Pesticides: benefits and hazards. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, 2, 70-76.

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., ... & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13, 614-629.

Marchante, H., Morais, M., Freitas, H., & Marchante, E. (2014). *Guia prático para a identificação de plantas invasoras em Portugal*. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press.

Marin-Morales, M. A., de Campos Ventura- Camargo, B., & Hoshina, M. M. (2013). Toxicity of herbicides: impact on aquatic and soil biota and human health. In A. J. Price, & J. A. Kelton (Eds.), *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*. IntechOpen.

Marschner, P. (2023). Rhizosphere biology. In *Marschner's Mineral Nutrition of Plants* (pp. 587-614). Academic Press.

Martins, P. M., Merfa, M. V., Takita, M. A., & De Souza, A. A. (2018). Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough? *Frontiers in Microbiology*, 9, 1099.

McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8(4): e61217.

Mendes, L. W., Kuramae, E. E., Navarrete, A. A., Van Veen, J. A., & Tsai, S. M. (2014). Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *The ISME journal*, 8, 1577-1587.

Microsoft Corporation. (2018). Microsoft Excel.

Miransari, M. (2016). Soybeans, stress, and plant growth-promoting rhizobacteria. In *Environmental Stresses in Soybean Production* (pp. 177-203). Academic Press.

Moço, VEDOPM. 2019. Impactes da intensidade de mobilização do solo em plantações de eucalipto. Dissertação doutoral, Escola Superior Agrária de Coimbra, IPC

Morais, M.C., Marchante, E. & Marchante, H. (2017) – “Big troubles are already here: risk assessment protocol shows high risk of many alien plants present in Portugal”. *Journal for Nature Conservation* 35: 1–12.

Moretto, J. A. S., Altarugio, L. M., Andrade, P. A., Fachin, A. L., Andreote, F. D., & Stehling, E. G. (2017). Changes in bacterial community after application of three different herbicides. *FEMS Microbiology Letters*, 364, fnx113.

Morsi, M. M., & Abdelmigid, H. M. (2016). Allelopathic activity of *Eucalyptus globulus* leaf aqueous extract on *Hordeum vulgare* growth and cytogenetic behavior. *Aust J Crop Sci*, 10, 1551-1556.

Mousavi, B., Hedayati, M. T., Hedayati, N., Ilkit, M., & Syedmousavi, S. (2016). *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Current medical mycology*, 2, 36.

Muthukumar, A., Raj, T. S., Prabhukarthikeyan, S. R., Kumar, R. N., & Keerthana, U. (2022). *Pseudomonas* and *Bacillus*: A biological tool for crop protection. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 145-158). Elsevier.

Naveh, Z. (1975). The evolutionary significance of fire in the Mediterranean region. *Vegetatio* 29,199-208.

Nelson, K. M., Bisbing, S., Grossenbacher, D. L., Ritter, M., & Yost, J. M. (2021). Testing an invasion mechanism for *Eucalyptus globulus*: Is there evidence of allelopathy? *American Journal of Botany*, 108, 607-615.

Nikolenko, S. I., Korobeynikov, A. I., & Alekseyev, M. A. (2013, January). BayesHammer: Bayesian clustering for error correction in single-cell sequencing. In *BMC genomics* (Vol. 14, No. 1, pp. 1-11). BioMed Central.

- Nji, Q. N., Babalola, O. O., & Mwanza, M. (2023). Soil *Aspergillus* species, pathogenicity and control perspectives. *Journal of Fungi*, 9, 766.
- Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A., Korobeynikov, A., Lapidus, A., ... & Pevzner, P. A. (2013). Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. In *Research in Computational Molecular Biology: 17th Annual International Conference, RECOMB 2013, Beijing, China, April 7-10, 2013. Proceedings* 17, 158-170. Springer Berlin Heidelberg.
- O'Reilly-Wapstra, J. M., Humphreys, J. R., & Potts, B. M. (2007). Stability of genetic-based defensive chemistry across life stages in a *Eucalyptus* species. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 1876-1884.
- Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Solymos P, Stevens M, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, De Caceres M, Durand S, Evangelista H, FitzJohn R, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill M, Lahti L, McGlinn D, Ouellette M, Ribeiro Cunha E, Smith T, Stier A, Ter Braak C, Weedon J (2022). *_vegan: Community Ecology Package_*. R package version 2.6-4.
- Oliveira T, Ezequiel J, Marques C, Muñoz L, Maggioli S, Teixeira C, Bandeira J, Pereira J. (2021) "O Eucalipto e o Fogo em Portugal nos Últimos 40 Anos" in Pestana M. (editor). *As plantações de eucalipto e os recursos naturais em Portugal. Sétimo caderno técnico da Revista Silva Lusitana, Edição INIAV, ISBN 978-972-5797.*
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics*, 12, 1-10.
- Oren, A. (2014). The Family Xanthobacteraceae. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bowman, D. M., Williamson, G. J., Keenan, R. J., & Prior, L. D. (2014). A warmer world will reduce tree growth in evergreen broadleaf forests: evidence from Australian temperate and subtropical eucalypt forests. *Global ecology and biogeography*, 23, 925-934.
- Osteen, C. D., Fernandez-Cornejo, J. (2016). *Herbicide use trends: A backgrounder. Choices* 31 (4). Agricultural and Applied Economics Association.
- Ozimek E, Hanaka A. (2021). *Mortierella* species as the plant growth-promoting fungi present in the agricultural soils. *Agriculture (Switzerland)* 11: 7.
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., ... & Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 6548-6553.
- Pereira, E., Coelho, V., Tavares, R.M., Lino-Neto, T., and Baptista, P. (2012) Effect of competitive interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on *Castanea sativa* performance. *Mycorrhiza* 22: 41–49.
- Pertile, M., Sousa, R. M. S., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., de Souza Oliveira, L. M., de Araujo, F. F., ... & Araujo, A. S. F. (2021). Response of soil bacterial communities to the application of the herbicides imazethapyr and flumyazin. *European Journal of Soil Biology*, 102, 103252.
- Pinto, M., Soares, C., Martins, M., Sousa, B., Valente, I., Pereira, R., & Fidalgo, F. (2021). Herbicidal effects and cellular targets of aqueous extracts from young *Eucalyptus globulus* Labill. Leaves. *Plants*, 10, 1159.

Pinto, M., Sousa, B., Martins, M., Pereira, C., Soares, C., & Fidalgo, F. (2023). Unveiling the efficacy of pre-emergent application of young *Eucalyptus globulus* leaves as a weed control strategy: Bridging macroscopic effects and cellular responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 203, 108010.

Potts BM, Vaillancourt RE, Jordan G, *et al.*, (2004) Exploration of the *Eucalyptus globulus* gene pool. In: Borralho N, Pereira JS, Marques C, Coutinho J, Madeira M and Tomé M (eds) *Eucalyptus in a changing world - IUFRO Conference*. RAIZ, Instituto de Investigação de Floresta e Papel, Aveiro, pp. 46-61

Potts, B. M., McGowen, M. H., Williams, D. R., Suitor, S., Jones, T. H., Gore, P. L., & Vaillancourt, R. E. (2008). Advances in reproductive biology and seed production systems of *Eucalyptus*: the case of *Eucalyptus globulus*. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 70, 145-154.

Price, A., & Kelton, J. (Eds.). (2013). *Herbicides: Current Research and Case Studies in Use*. BoD–Books on Demand.

Puig, C. G., Álvarez-Iglesias, L., Reigosa, M. J., & Pedrol, N. (2013). *Eucalyptus globulus* leaves incorporated as green manure for weed control in maize. *Weed science*, 61, 154-161.

Puig, C. G., Gonçalves, R. F., Valentão, P., Andrade, P. B., Reigosa, M. J., & Pedrol, N. (2018). The consistency between phytotoxic effects and the dynamics of allelochemicals release from *Eucalyptus globulus* leaves used as bioherbicide green manure. *Journal of Chemical Ecology*, 44, 658-670.

Pujalte, M. J., Lucena, T., Ruvira, M. A., Arahál, D. R., & Macián, M. C. (2014). *The family Rhodobacteraceae*. Springer.

Quarantin, A., Hadelér, B., Kröger, C., Schäfer, W., Favaron, F., Sella, L., & Martínez-Rocha, A. L. (2019). Different hydrophobins of *Fusarium graminearum* are involved in hyphal growth, attachment, water-air interface penetration and plant infection. *Frontiers in Microbiology*, 10, 751.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41, D590-D596.

R Core Team (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rauwane, M. E., Ogugua, U. V., Kalu, C. M., Ledwaba, L. K., Woldesemayat, A. A., & Ntushelo, K. (2020). Pathogenicity and virulence factors of *Fusarium graminearum* including factors discovered using next generation sequencing technologies and proteomics. *Microorganisms*, 8, 305.

Rebeiz, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H. J., & Wu, S. M. (1984). Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme and microbial technology*, 6, 390-396.

Reis, M. (2018). A floresta em Portugal: gestão, monoculturas (eucaliptização) e incêndios. *Cerna: Revista galega de ecoloxía e medio ambiente*, 79, 8-10.

Rodríguez-Díaz, M., Rodelas-Gonzalés, B., Pozo-Clemente, C., Martínez-Toledo, M. V., & González-López, J. (2008). A review on the taxonomy and possible screening traits of plant growth

- promoting rhizobacteria. *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*, 55-80.
- Roman, E. S., Beckie, H., Vargas, L., Hall, L., Rizzardi, M. A., & Wolf, T. M. (2007). Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação (p. 152). Passo Fundo: Berthier.
- Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Barthelmebs, L., Calvayrac, C., Bertrand, C., Cooper, J. F., ... & Martin-Laurent, F. (2016). Ecotoxicological impact of the bioherbicide leptospermon on the microbial community of two arable soils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 775.
- Ruuskanen, S., Fuchs, B., Nissinen, R., Puigbò, P., Rainio, M., Saikkonen, K., & Helander, M. (2023). Ecosystem consequences of herbicides: the role of microbiome. *Trends in Ecology & Evolution*.
- Sadlon AE, Lamson DW (2010) Immune-modifying and antimicrobial effects of *Eucalyptus* oil and simple inhalation devices. *Alternative Medicine Review* 15: 33-43
- Sah, S., & Singh, R. (2016). Phylogenetical coherence of *Pseudomonas* in unexplored soils of Himalayan region. *3 Biotech*, 6, 1-10.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22, 855-872.
- Santoyo, G., Pacheco, C.H., Salmeron, J.H., Leon, R.H., 2017. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. *Span. J. Agric. Res.* 15, 13.
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27, 863–864.
- Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84, 603-615.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., & Dar, O. I. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1, 1446.
- Shemshura, O. N., Sadanov, A. K., Shemsheyeva, Z. N., Lozovicka, B., Kamzolova, S. V., & Morgunov, I. G. (2018). Antifungal potential of organic acids produced by *Mortierella alpina*. *International Journal of Engineering and Technology (UAE)*, 7, 1218-1221.
- Sherwani SI, Arif IA, Khan HA (2015) Modes of action of different classes of herbicides. In A Price, J Kelton, L Sarunaite, eds, *Herbicides, Physiology of Action, and Safety*. IntechOpen: 165-186
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35, 652-680.
- Graphpad software (1994). Graphpad software. San Diego, CA, USA
- Silva JN, Feith H, Pereira J C. 2007. Exploração e silvicultura pós-fogo em eucaliptais. O eucaliptal em Portugal-Impactes ambientais e investigação científica. ISAPress, Lisboa, 285-312
- Silva JS., dos Santos P, Sérgio A, Gomes F (2016) Effects of heat on dehiscence and germination in *Eucalyptus globulus* Labill. *International Journal of Wildland Fire* 25, 478-483.

- Silva, J. S., Nereu, M., Pinho, S., Queirós, L., Jesús, C., & Deus, E. (2021). Post-fire demography, growth, and control of *Eucalyptus globulus* wildlings. *Forests*, 12, 156.
- Smith, S.E. and Read, D.J. (2008) Mycorrhizal Symbiosis. 3rd Edition, Academic Press, London.
- Smith, S.E., Read, D.J., (2008). Mycorrhizal Symbiosis. third ed. Academic Press, San Diego
- Soares P, Tomé M, Pereira JS (2007) A produtividade do eucaliptal. In AM Alves, JS Pereira, JMN Silva, eds, O Eucaliptal em Portugal – Impactes Ambientais e Investigação Científica. ISAPress: 28-56
- Souto XC, Bolaño JC, González L, Reigosa MJ (2001) Allelopathic effects of tree species on some soil microbial populations and herbaceous plants. *Biol Plant* 4:269–275.
- Sylvia, D.M. (2005). Mycorrhizal symbiosis. In: Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. (Eds.), *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Pearson/Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, pp. 263-282.
- Takano, H.K. and Dayan, F.E. (2020), Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Manag Sci*, 76: 3911-3925.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Polme, S., Koljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., ... Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346, 1256688–1256688.
- Tomé, M., Almeida, M. H., Barreiro, S., Branco, M. R., Deus, E., Pinto, G., ... & Rodríguez-Soalleiro, R. (2021). Opportunities and challenges of *Eucalyptus* plantations in Europe: The Iberian Peninsula experience. *European Journal of Forest Research*, 140, 489-510.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results*. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.
- Vega JA, Fernández C, Pe´rez-Gorostiaga P, Fonturbel T (2008) The influence of fire severity, serotiny, and post-fire management on *Pinus pinaster* Ait. recruitment in three burnt areas in Galicia (NW Spain). *For Ecol Manag* 256:1596–1603
- Wang, Z., Wang, X., & Wang, T. (2022). Effects of imazethapyr on soybean root growth and soil microbial communities in sloped fields. *Sustainability*, 14, 3518.
- Warnes G, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W, Liaw A, Lumley T, Maechler M, Magnusson A, Moeller S, Schwartz M, Venables B (2022). *_gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data_*. R package version 3.1.3.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18, 315-322.
- Xu, J., Liu, B., Qu, Z. L., Ma, Y., & Sun, H. (2020). Age and species of *Eucalyptus* plantations affect soil microbial biomass and enzymatic activities. *Microorganisms*, 8, 811.
- Zhang, D. J., Zhang, J., Yang, W. Q., & Wu, F. Z. (2010). Potential allelopathic effect of *Eucalyptus grandis* across a range of plantation ages. *Ecological Research*, 25, 13-23.

6. Anexos

Anexo 1: Processamento das *reads* fúngicas e bacterianas sequenciadas pelo *Illumina MiSeq*, utilizando DNA obtido de amostras de solo com diferentes concentrações de EucaBio conforme descrito na secção Material e Métodos.

Amostras	Fungos				Bactérias			
	<i>Raw reads</i>	<i>Merged reads</i>	<i>Sequences clustered into ASVs</i>	<i>Fungal sequences</i>	<i>Raw reads</i>	<i>Merged reads</i>	<i>Sequences clustered into ASVs</i>	<i>Bacterial sequences</i>
Control_T0_R1	47 497	33 293	28 222	22 359	79 995	62 187	29 928	29 637
Control_T1_R1	91 182	73 440	62 220	50 026	215 458	164 089	83 252	82 745
Control_T2_R1	85 943	67 736	57 428	45 197	68 714	53 003	25 885	25 751
Control_T0_R2	53 859	39 470	33 893	28 043	83 180	64 359	31 749	31 531
Control_T1_R2	88 939	71 701	60 249	48 293	70 555	52 722	26 947	26 738
Control_T2_R2	110 949	89 068	75 469	58 850	73 056	56 162	28 388	28 193
Control_T0_R3	51 628	38 125	32 272	28 117	96 169	74 437	37 743	37 503
Control_T1_R3	73 958	59 968	50 547	41 116	117 162	89 082	45 685	45 348
Control_T2_R3	93 369	76 821	64 056	52 174	83 044	63 929	32 842	32 668
Control_T0_R4	31 262	20 725	17 285	14 002	101 371	77 832	37 122	36 872
Control_T1_R4	83 016	62 563	51 714	41 920	82 295	61 673	31 763	31 555
Control_T2_R4	73 435	47 810	50 709	41 771	65 827	49 761	24 754	24 637
Control_T0_R5	47 276	34 790	29 600	19 531	60 246	46 246	23 005	22 801
Control_T1_R5	107 790	79 921	67 370	50 107	94 843	73 036	37 835	37 476
Control_T2_R5	71 775	58 683	49 786	38 276	62 788	55 191	29 661	29 476
2.5%_T0_R1	111 005	92 948	81 482	78 015	44 131	33 154	17 023	16 932
2.5%_T1_R1	161 068	135 542	118 196	113 273	76 392	59 028	32 437	32 226
2.5%_T2_R1	141 185	121 259	104 289	99 013	40 982	31 129	16 862	16 807
2.5%_T0_R2	76 021	61 170	53 470	51 604	76 261	59 366	32 035	31 909
2.5%_T1_R2	217 773	183 529	159 937	154 978	59 977	40 591	20 517	20 426
2.5%_T2_R2	108 196	92 686	79 674	77 319	48 618	37 690	20 710	20 624
2.5%_T0_R3	118 903	92 948	81 065	77 086	92 534	71 045	37 722	37 590
2.5%_T1_R3	135 663	113 635	98 023	90 855	97 209	74 569	40 125	39 816
2.5%_T2_R3	111 121	94 488	81 940	78 750	74 583	57 683	31 812	31 735
2.5%_T0_R4	71 690	58 456	50 827	48 660	74 168	58 103	29 815	29 632
2.5%_T1_R4	147 643	124 058	107 846	101 713	15 950	71 768	39 562	39 142
2.5%_T2_R4	96 003	80 956	69 596	66 635	81 114	62 507	32 784	32 639
2.5%_T0_R5	133 153	108 175	91 705	89 047	82 756	61 532	32 461	32 288
2.5%_T1_R5	155 883	129 890	112 616	104 959	67 409	51 149	27 999	27 761
2.5%_T2_R5	93 073	77 889	67 776	63 923	73 221	56 066	30 350	30 230
5%_T0_R1	136 188	114 481	99 875	92 184	99 354	78 231	44 147	44 046
5%_T1_R1	158 609	95 897	119 077	111 732	62 395	49 029	29 009	28 918
5%_T2_R1	110 868	94 098	82 359	79 832	94 482	74 203	43 277	43 197
5%_T0_R2	113 313	95 556	82 676	76 103	89 065	69 469	38 425	38 298
5%_T1_R2	204 143	172 269	150 527	141 925	90 742	70 567	35 604	35 507
5%_T2_R2	48 933	39 993	34 834	34 126	111 280	85 004	48 229	48 114
5%_T0_R3	119 264	101 838	89 256	80 550	68 655	54 243	30 826	30 748

Anexo 1: Continuação

Amostras	Fungos				Bactérias			
	Raw reads	Merged reads	Sequences clustered into ASVs	Fungal sequences	Raw reads	Merged reads	Sequences clustered into ASVs	Bacterial sequences
5%_T1_R3	103 768	88 050	77 182	73 139	69 978	55 153	30 420	30 299
5%_T2_R3	124 080	107 053	93 073	90 323	83 060	64 573	37 424	37 338
5%_T0_R4	114 655	96 158	83 850	73 901	54 646	42 591	23 864	23 794
5%_T1_R4	106 358	89 588	78 804	75 435	72 831	57 437	32 825	32 680
5%_T2_R4	94 408	81 469	70 838	66 845	56 871	43 055	25 087	25 033
5%_T0_R5	96 670	79 575	69 270	62 110	79 082	62 840	35 095	34 999
5%_T1_R5	114 065	97 097	85 079	81 257	76 716	60 174	28 869	27 398
5%_T2_R5	86 859	73 057	63 612	61 025	85 769	66 382	37 582	37 470
10%_T0_R1	120 849	103 886	90 495	76 792	86 889	68 450	42 040	41 941
10%_T1_R1	69 051	59 292	51 386	47 814	95 465	74 198	43 362	43 117
10%_T2_R1	120 050	104 642	91 497	87 874	99 431	76 672	47 147	47 018
10%_T0_R2	129 856	110 773	97 201	87 497	71 475	56 375	34 254	34 158
10%_T1_R2	110 855	95 573	83 985	77 425	67 232	52 382	31 181	31 029
10%_T2_R2	105 963	92 128	80 634	77 220	65 956	52 125	30 448	30 348
10%_T0_R3	118 113	101 630	89 663	77 113	93 116	73 435	44 104	43 985
10%_T1_R3	96 764	83 710	73 335	67 606	68 082	53 023	32 285	32 070
10%_T2_R3	99 921	86 509	76 145	73 430	60 814	47 958	28 578	28 461
10%_T0_R4	168 696	146 232	128 599	111 877	102 628	81 454	51 258	51 118
10%_T1_R4	90 811	78 732	69 150	64 682	69 049	54 388	33 843	33 655
10%_T2_R4	127 869	110 349	96 902	91 777	84 249	67 471	41 761	41 715
10%_T0_R5	36 572	31 296	27 293	24 193	89 039	68 467	40 879	40 736
10%_T1_R5	118 222	101 111	88 789	82 510	96 957	73 962	46 104	45 929
10%_T2_R5	102 263	88 963	77 301	73 707	88 494	69 166	41 225	41 109
Total	6 338 294	5 242 748	4 591 949	4 197 616	4 793 810	3 771 566	2 077 925	2 066 916

Anexo 2: Análise estatística (ANOVA) dos índices de diversidade (S , $1-D$, H) da comunidade bacteriana e fúngica nas diferentes concentrações de EucaBio_sólido e tempos de amostragem.

S		Fungi												
		Control			2.5 %			5 %			10 %			
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	
Bacteria	Control	T0	-	ns	ns	ns	*	**	**	**	**	**	**	**
		T1	*	-	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**
		T2	**	ns	-	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*
	2.5 %	T0	**	*	**	-	ns	ns	**	*	**	**	**	**
		T1	**	*	**	ns	-	ns	**	**	**	**	**	**
		T2	**	*	**	ns	*	-	ns	ns	**	**	**	**
	5 %	T0	**	*	**	**	**	**	-	ns	**	**	**	**
		T1	**	*	**	**	**	**	ns	-	**	**	**	**
		T2	**	*	**	**	**	**	*	*	-	**	**	**
	10 %	T0	**	*	**	**	**	**	**	**	*	-	ns	Ns
		T1	**	*	**	**	**	**	**	**	**	ns	-	Ns
		T2	**	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-

Anexo 2: Continuação

1-D		Fungi												
		Control			2.5 %			5 %			10 %			
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	
Bacteria	Control	T0	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
		T1	**	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
		T2	**	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
	2.5 %	T0	**	**	**	-	ns	ns	ns	ns	**	**	**	**
		T1	**	**	**	ns	-	ns	ns	ns	**	**	**	**
		T2	**	**	**	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
	5 %	T0	**	**	**	**	**	**	-	*	**	**	**	**
		T1	**	**	**	**	**	**	ns	-	**	**	**	**
		T2	**	**	**	**	**	**	ns	ns	-	**	**	**
	10 %	T0	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-	ns	Ns
		T1	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-	Ns
		T2	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	-

H		Fungi												
		Control			2.5 %			5 %			10 %			
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	
Bacteria	Control	T0	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**	
		T1	**	-	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	**	**	
		T2	**	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**	
	2.5 %	T0	**	**	**	-	ns	ns	ns	ns	**	**	**	**
		T1	**	**	**	ns	-	ns	ns	*	**	**	**	**
		T2	**	**	**	ns	ns	-	ns	ns	ns	**	*	**
	5 %	T0	**	**	**	**	**	**	-	*	**	**	**	**
		T1	**	**	**	**	**	**	ns	-	*	**	**	**
		T2	**	**	**	**	**	**	ns	ns	-	**	**	**
	10 %	T0	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-	ns	ns
		T1	**	**	**	**	**	**	**	**	**	ns	-	ns
		T2	**	**	**	**	**	**	**	**	**	ns	ns	-