

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE METAGENÔMICA E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS DE SOLO E
ÁGUA DE UMA ÁREA AGRÍCOLA COM ADUBAÇÃO
ORGÂNICA**

Aylan Kener Meneghine
Tecnólogo em Biocombustíveis

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE METAGENÔMICA E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS DE SOLO E
ÁGUA DE UMA ÁREA AGRÍCOLA COM ADUBAÇÃO
ORGÂNICA**

Aylan Kener Meneghine

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves

Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2016

M541a Meneghine, Aylan Kener
Análise metagenômica e perfil biotecnológico de microrganismos de solo e água de uma área agrícola com adubação orgânica / Aylan Kener Meneghine. -- Jaboticabal, 2016
iv, 89 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves

Coorientador: Alessandro de Mello Varani

Banca examinadora: Hugo Sarmento, Rodrigo Matheus Pereira, Everlon Cid Rigobelo, Silvana Pompéia do Val Moraes

Bibliografia

1. Bioemulsificante. 2. Ciclos biogeoquímicos. 3. Exopolissacarídeo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 579.69

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

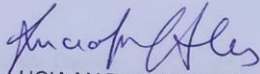
TÍTULO: ANÁLISE METAGENÔMICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS DE SOLO E ÁGUA DE UMA ÁREA AGRÍCOLA COM ADUBAÇÃO ORGÂNICA

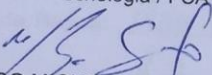
AUTOR: AYLAN KENER MENECHINE

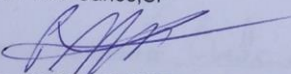
ORIENTADORA: LUCIA MARIA CARARETO ALVES


COORIENTADOR: ALESSANDRO DE MELLO VARANI

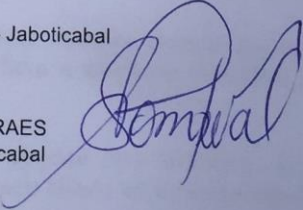
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. HUGO MIGUEL PRETO DE MORAIS SARMENTO
UFSCar / São Carlos, SP


Prof. Dr. RODRIGO MATHEUS PEREIRA
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / UFGD - Dourados, MS


Prof. Dr. EVERLON CIB RIGOBELLO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pós-doutoranda SILVANA POMPÉIA DO VAL DE MORAES
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de dezembro de 2016.

DADOS CURRICULARES

AYLAN KENER MENEZHINE – nascido em 4 de março de 1990, no município de Taquaritinga – SP, é Tecnólogo em Biocombustíveis, formado pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC – Centro Estadual de Educação Tecnológica “Paula Souza”) em dezembro de 2010, fazendo parte da primeira turma de formandos do curso. Em março de 2011 iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, onde defendeu sua dissertação de mestrado em fevereiro de 2013. Em março de 2013 iniciou o curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e de Plantas (Departamento de Tecnologia). No período de fevereiro a novembro de 2015 foi *International Visiting Research Student* na *University of New South Wales* (UNSW) em Sydney-Austrália, onde desenvolveu seu doutorado sanduíche com bolsa CAPES (Processo n. BEX 9552/14-6) sob supervisão do Prof. Associado Dr. Torsten Thomas na *School of Biotechnology and Biomolecular Sciences* (BABS) e *Center for Marine BioInnovation* (CMB) na área de bioinformática e estatística multivariada aplicada à ecologia microbiana. Em 16 de dezembro de 2016 defendeu sua tese de doutorado em Microbiologia Agropecuária.

*“E o futuro é uma astronave
Que tentamos pilotar
Não tem tempo nem piedade
Nem tem hora de chegar
Sem pedir licença muda nossa vida
E depois convida a rir ou chorar
Nessa estrada não nos cabe
Conhecer ou ver o que virá
O fim dela ninguém sabe
Bem ao certo onde vai dar
Vamos todos numa linda passarela
De uma aquarela que um dia enfim
Descolorirá”*

(Vinícius de Moraes/Toquinho)

*À minha família de sangue, minha mãe (**Neideli**) e irmão (**Chandler**), e também àqueles que são minha família por escolha e sintonia única: **Milene, Adauto e Gabriel.***

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus, às energias da natureza e ao universo por terem me ajudado a canalizar força, paciência e dedicação para não desistir no meio do caminho devido as dificuldades encontradas, além de todos os momentos bons e inclusive ruins, que me fizeram crescer como pessoa e profissionalmente.

À Profa. **Dra. Lucia Maria Carareto Alves** pela orientação, paciência, confiança, ensinamentos e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, por todos esses anos de orientação desde 2011.

Ao Prof. **Dr. Alessandro de Melo Varani** pela co-orientação e ensinamentos na área de bioinformática assim como pela oportunidade de crescimento profissional.

À Profa. **Dra. Luciana Maria Saran** pela oportunidade de crescimento profissional, confiança e ensinamentos.

Ao Professor Associado **Dr. Torsten Thomas** (UNSW, Sidney – AUS) pela orientação, paciência, ensinamentos e amizade no período em que dediquei meus estudos em outro país aprendendo novos conceitos, língua e cultura em Sydney (Austrália), foi uma experiência incrível!

Ao **Dr. Shaun Nielsen** (UNSW, Sidney – AUS) pela paciência, amizade, orientação e ensinamentos no que diz respeito a toda metodologia estatística desenvolvida neste trabalho, muito obrigado!!!

Aos membros da banca avaliadora da defesa desta tese, que contribuíram muito com suas sugestões e discussão durante a arguição para que este trabalho ficasse melhor.

Aos funcionários da **seção de Pós-Graduação** pela paciência e auxílio em todos os momentos necessários, deixo aqui meu muito obrigado!

A todos os funcionários, professores, companheiros e amigos de trabalho do Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e de Plantas (LBMP) que me auxiliaram no aprendizado de novas metodologias no decorrer desses anos com suas experiências. Além das pausas de bate-papo e risadas. Um agradecimento em especial ao amigo sempre disposto **Wellington Pine Omori** pelas conversas inspiradoras sobre metagenômica e bioinformática, muito sucesso a você Omori.

À **Dra. Cristiane Moretto**, uma amiga, companheira e profissional formidável por todo o auxílio e conselhos, sempre me mostrando que há luz mesmo quando tudo parece estar acabado.

A grande amiga e confidente **Daniele Berlarmino**, em especial, por todo apoio, companheirismo, paciência, risadas, estudos. E também pela grande pessoa e amiga que é: realmente especial. Sempre do meu lado em todos os momentos, desde os excelentes até os ruins. Muito obrigado Dani!!!

Aos pesquisadores/pós-doutorandos e alunos de doutorado do grupo de pesquisa do Prof. Associado Dr. Torsten Thomas sempre atenciosos e generosos, por toda ajuda, risadas, ensinamentos tanto relacionados a análises quanto a “*How to speak Aussie*”! Um muito obrigado por tudo que fizeram por mim em um continente e país completamente novo: **Ana, Lucas, Cristina, Shaun, Manu, David, Giampiero, Alex, Mary, Jess, John, Jun, Enrique**. E em especial, gostaria de agradecer aos **Drs. Ana e Lucas**, por estarem por perto me ajudando com inglês, mas na minha língua nativa, nas muitas vezes que me faltava vocabulário, e até mesmo para ter conversas ótimas em nossa própria língua lembrando como é bom falar português, além de todos os valiosos conselhos dados!

Às pessoas maravilhosas que conheci no meu período de intercâmbio de doutorado e que sempre estiveram presentes para conversar, rir e chorar quando mais precisei e hoje são grandes amigos **Ricardo Álfan, Giovanna Calì, Fernanda Bernardi, Silas Gubitoso, Dan Constantin, Giulia Persoz, Tatiana Neves.**

À Profa. **Dra. Maria Benincasa** pela amizade, conselhos e oportunidades de sempre, desde o final da minha graduação até o final dessa etapa do doutorado! Muito obrigado, aprendi muito com você sobre biotecnologia, ética e como é gratificante ensinar!

Aos amigos de longa data **Marcio, Priscila, Chrystian e Guilherme** que sempre mantiveram contato, e estiveram ao meu lado mesmo quando eu permaneci distante.

Aos amigos de pós-graduação, disciplinas, choros e saideiras **Ju Roviero, Elisa, Claudio, Suzana, Luiz Flávio (Pudendo), Carlos, Gabriela, André e Amanda** que tornaram os momentos mais difíceis também os mais divertidos. Obrigado pelo companheirismo e amizade, vocês são demais!

Ao **Adriano** pela amizade, companheirismo, paciência e apoio incondicional durante toda essa jornada de pós-graduação.

À **Maria Regina, Ronaldo, Sonia, Carlos e Raphael** pelo apoio, confiança e acolhimento nos momentos mais difíceis que passei para chegar até aqui. Muito obrigado!

À psicóloga e amiga **Luiza Capelari** no qual foi de fundamental importância para que essa tese tivesse seu fim.

Enfim a TODOS que participaram de mais essa conquista da minha vida, mesmo aqueles que eu possa ter esquecido de mencionar, meu MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO..... | iii |
| ABSTRACT | iv |
| CAPÍTULO 1 – Considerações gerais..... | 5 |
| 1. Introdução | 5 |
| 2. Revisão de Literatura | 7 |
| 2.1 Aspectos físicos, químicos e microbiológicos do solo na agricultura | 7 |
| 2.2 Aspectos físicos, químicos e microbiológicos da água para a agricultura | 9 |
| 2.3 Ciclos biogeoquímicos | 13 |
| 2.4 Exopolissacarídeos bacterianos..... | 17 |
| 2.5 Metagenômica..... | 20 |
| Referências bibliográficas | 21 |
| CAPÍTULO 2 – Análise metagenômica de solo da horta e água usada para irrigação de uma área agrícola sob efeito de composto orgânico | 33 |
| Resumo..... | 33 |
| Introdução | 34 |
| Material e métodos..... | 36 |
| Caracterização da área de estudo e amostragem | 36 |
| Análises física e química das amostras de solo e água..... | 37 |
| Extração de DNA e sequenciamento | 38 |
| Processamento das sequencias de DNA..... | 38 |
| Análises estatísticas das comunidades microbianas e perfil funcional | 39 |
| Resultados | 42 |
| Análises física e química das amostras de solo e água..... | 42 |
| Processamento, qualidade e anotação das sequencias | 43 |
| Comparação taxonômica entre os ambientes..... | 44 |
| Comparação do metabolismo dos ciclos biogeoquímicos entre os ambientes | 47 |
| Discussão..... | 51 |
| Conclusão | 56 |
| Referências bibliográficas | 57 |
| Informação suplementar..... | 63 |
| CAPÍTULO 3 – Production, characterization and bioemulsifying activity of an exopolysaccharide produced by <i>Sphingomonas</i> sp. isolated from freshwater | 67 |

| | |
|--|----|
| Abstract..... | 67 |
| Introduction..... | 67 |
| Material and methods..... | 67 |
| Microorganism | 69 |
| EPS Production..... | 70 |
| EPS Extraction..... | 70 |
| EPS monosaccharide composition by RP-HPLC | 71 |
| Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) | 71 |
| Surface Tension Measurement..... | 71 |
| Emulsifying Activity | 71 |
| Thermal and pH stability | 72 |
| Data analysis | 72 |
| Results | 73 |
| Discussion | 77 |
| Conclusion..... | 77 |
| References..... | 80 |
| CAPÍTULO 4 – Considerações finais | 83 |
| APÊNDICE | 86 |

ANÁLISE METAGENÔMICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRO-ORGANISMOS DE SOLO E ÁGUA DE UMA ÁREA AGRÍCOLA COM ADUBAÇÃO ORGÂNICA

RESUMO - O composto orgânico produzido a partir de carcaças, resíduos animais e vegetais é uma alternativa viável para a substituição total ou parcial dos fertilizantes minerais utilizados na atualidade. No processo de compostagem participam diferentes populações microbianas, e com isso o composto torna-se um sistema rico para utilização como fertilizante no solo, complementando assim as necessidades nutricionais e microbianas do meio ambiente. Entretanto, há poucos trabalhos envolvendo análise da diversidade bacteriana em solos sob uso de composto orgânico feito a partir de carcaças, e também pouco se conhece sobre o impacto ambiental do uso agrícola de composto orgânico na qualidade da água. Existe também a questão se há influência da água utilizada para irrigação na qualidade do solo. O objetivo central desse trabalho foi analisar a diversidade bacteriana e perfil funcional de um solo de horta e da água de um córrego utilizada para irrigação. E como objetivo secundário, através do isolamento de bactérias da água verificar o potencial biotecnológico de produção e uso de exopolissacarídeo como bioemulsificante de óleo e hidrocarbonetos. As amostras de solo e água utilizadas nesse trabalho foram coletadas na área do departamento rural da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, em setembro de 2014. Todo material coletado foi transportado até o Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e de Plantas, onde realizou-se a extração de DNA total e sequenciamento através de tecnologia Ion Proton (Life Technologies), isolamento bacteriano, produção e aplicação de exopolissacarídeo como bioemulsificante. Ao analisar o DNA metagenômico observou-se que tanto na água quanto no solo há uma abundância de bactérias encontradas normalmente em áreas agrícolas sob influência de composto orgânico feito a partir de outras fontes. Verificou-se também, através da análise dos genes relacionados com os ciclos biogeoquímicos, abundância de genes do processo de desnitrificação na amostra de solo. Além de se observar que na análise da estrutura taxonômica dos ciclos biogeoquímicos, não há bactérias em comum entre as amostras de solo e água com do composto orgânico. Porém ao avaliar o perfil funcional total da água, solo e outros dez metagenomas, através de uma análise de agrupamento hierárquico, notou-se que a água causa maior influência no solo do que o próprio composto orgânico. Com relação ao isolamento bacteriano, foi possível isolar a bactéria *Sphingomonas sp.*, sendo que o isolado identificado demonstrou produzir grande quantidade de exopolissacarídeo (EPS). O EPS formou emulsões estáveis após 24 horas e 168 horas. Além disso o EPS foi um melhor agente emulsificante para hexano e querosene dentre todos os óleos analisados. Os resultados mostraram contribuição significativa com relação ao potencial do EPS como agente bioemulsificante que aumentaria a degradação de hidrocarbonetos e efeitos de emulsificação em biotecnologia ambiental.

Palavras-chave: bioemulsificante, ciclos biogeoquímicos, exopolissacarídeo.

METAGENOMIC ANALYSIS AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MICROORGANISMS FROM SOIL AND FRESHWATER OF AN AGRICULTURAL AREA WITH ORGANIC FERTILIZATION

ABSTRACT – The organic compost produced from carcasses, animal and vegetable waste is a viable alternative to full or partial replacement of mineral fertilizers used nowadays. In the composting process there are involved different microbial populations, and the compost becomes a rich system for use as a fertilizer in the soil, thereby supplementing the nutritional and microbial requirements of the medium. However, there are few studies involving the analysis of bacterial diversity in soil under use of organic compost made from carcasses, and also little is known about the environmental impact of agricultural use of organic compost in water quality. Furthermore, there is also the question of whether there is influence of the water used for irrigation on soil quality. Because of these questions, the central objective of this study was to analyze the bacterial diversity and functional profile of a soil from vegetable garden and freshwater used for irrigation from a local stream. As a secondary objective, we aimed to verify the production and biotechnology potential of a bacterial exopolysaccharide as oil and hydrocarbons bioemulsifier. Soil and freshwater samples used in this study were collected at rural department of the Zoo Foundation Park of São Paulo, in September 2014. All material collected was transported to the Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e de Plantas where we proceeded with the total DNA extraction experiments, sequencing through Ion Proton technology (Life Technologies), bacterial isolation, production and application of exopolysaccharide as bioemulsifier. By analyzing the metagenomic DNA it was observed that both freshwater and soil were plenty of bacterial communities normally found in agricultural areas under influence of organic amendments. Through the analysis of genes related to biogeochemical cycles, it was found abundance of genes about denitrification process in the soil sample. Also it can be noted by the analysis of the taxonomic structure of biogeochemical cycles, there was no bacteria shared between soil and freshwater samples with the organic compost. But when evaluating the functional profile of freshwater, soil and other ten metagenomes, we observed that freshwater causes greater influence on the soil than the organic compost. Regarding the bacterial isolation, it was possible to identify the bacteria *Sphingomonas* sp., and it has been shown to produce large amount of exopolysaccharide (EPS). The EPS has shown stability in its emulsions after 24 hours and 168 hours. Additionally, it's a better emulsifying agent for hexane and kerosene among other oils analysed. Furthermore, our findings promoted significant contribution by showing EPS potential as a bioemulsifier agent that would enhance hydrocarbon degradation and emulsification effects in environmental biotechnology.

Keywords: bioemulsifier, biogeochemical cycles, exopolysaccharide.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) é uma entidade instituída e mantida pelo Governo do Estado de São Paulo. No cumprimento de sua função social, a FPZSP mantém grande número de espécies animais em condições de preservação que dependem diretamente do ambiente em que se encontram. O Sistema de Gestão Ambiental (SGA) dessa instituição possui estrutura para a reciclagem e aproveitamento da água e dos resíduos sólidos que gera. Desta forma o Zoológico de São Paulo possui uma Unidade de Produção de Composto Orgânico (UPCO) que, aproveitando os resíduos gerados no próprio Zoológico, sendo eles de origem vegetal ou animal (incluindo carcaças), produz um adubo orgânico que é utilizado em uma horta em sua Fazenda para a produção de alimentos para os animais. A horta fica localizada às margens de um riacho de onde é retirada água para irrigação por gotejamento. Além disso, a horta, onde são produzidos os alimentos, é irrigada por um sistema de gotejamento, para manter a necessidade hídrica dos vegetais cultivados e suprir na época de estiagem. O sistema é alimentado por uma motobomba posicionada próxima a área, aproveitando água do córrego Ribeirão do Lageado que possui uma vazão de aproximadamente 15 m³/h e é um afluente do rio Sorocaba, pertencente à Bacia hidrográfica do Rio Paraná.

Considerando métodos de microbiologia clássica, metagenômica, e o interesse de desvendar ambientes ainda não explorados. Este trabalho possui como objetivo desvendar o microbioma, perfil funcional e potencial biotecnológico do solo da horta onde se usa o composto orgânico produzido no Zoológico e da água de irrigação usada nesse sistema agrícola.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa fizeram análises preliminares, abordando diferentes aspectos, da mesma área de estudo. Como é o caso demonstrado na dissertação de mestrado de FIGUEIREDO (2015), que estudou o “Efeito do adubo orgânico na diversidade bacteriana de solos”. Onde, através de microbiologia clássica, avaliou-se o potencial de isolados bacterianos em produzir exoenzimas como celulasas, lipases e proteases, além de ter usado

a técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA para comparar a diversidade bacteriana do solo onde o composto era usado e solo de mata nativa. Esse trabalho mostrou que a população bacteriana nas áreas estudadas era influenciada tanto pelo composto como pelo próprio uso agrícola do solo, sendo que a aplicação do composto permite o aparecimento de uma população bacteriana importantes para a qualidade do solo. Outro estudo realizado na área avaliou a “Influência da adubação orgânica na qualidade da água destinada à irrigação de hortaliças” CÉLICO (2015). Nesse estudo foi possível verificar que o uso do composto não interferia na qualidade química, física e microbiológica da água ao longo do córrego Ribeirão do Lajeado.

Os micro-organismos dominam a biosfera, e constituem componentes essenciais à vida. Tais organismos, além de catalisarem transformações indispensáveis nos ciclos biogeoquímicos terrestres e aquáticos, produzem importantes componentes da atmosfera e representam uma enorme porção da diversidade genética da vida. Durante milênios, os micro-organismos presentes naturalmente nos mais variados ambientes vêm produzindo importantes compostos biológicos úteis ao meio ambiente, indústria, seres humanos e outros animais. Dentre os produtos produzidos pelos micro-organismos pode-se citar como exemplo os antibióticos, enzimas, drogas anticancerígenas, compostos antifúngicos, biopolímeros, biossurfactantes, inibidores enzimáticos, agentes antiparasitários, promotores de crescimento dentre outros (MORETTO et al., 2015; SACCO et al., 2015).

Em um estudo realizado por LOCEY e LENNON (2016), foi estimado que o planeta Terra é habitado por $10^{11} - 10^{12}$ espécies microbianas. Entretanto, para se chegar nos resultados obtidos pelos pesquisadores supracitados e outros que trabalham com ecologia microbiana, novas técnicas em microbiologia, como é o caso da metagenômica, tiveram que ser desenvolvidas e dominadas. Técnicas como metagenômica, por exemplo, são essenciais para se conhecer melhor quais, como e o que os micro-organismos dos mais variados habitats interagem e por fim produzem os variados biocompostos que conhecemos hoje em dia. Como exemplo de habitats estudados pode ser destacado os sedimentos aquáticos (ANDREOTE et al., 2012), compostos orgânico (MARTINS et al., 2013), solos oriundos de práticas agrícolas (MENDES et al., 2014; NIELSEN et al., 2014; YE et al., 2016), ambientes de água doce (MENECHINE et al., 2015;

NEWTON; MCLELLAN, 2015) e ambientes marinhos (THOMAS et al., 2010; ZOZAYA-VALDÉS; ROTH-SCHULZE; THOMAS, 2016).

Levando em consideração o exposto acima, para a pesquisa desta tese, partiu-se do princípio que o solo da horta, estava tendo seu microbioma influenciado devido à fertilização com adubo orgânico e também irrigação com água do córrego que corta a fazenda.

2. Revisão de Literatura

2.1 Aspectos físicos, químicos e microbiológicos do solo na agricultura

O solo é um compartimento essencial para o desenvolvimento do ser humano e outros organismos no planeta, uma vez que é a partir dele que ocorre a produção de nutrientes, que por sua vez são extremamente importantes para sobrevivência de qualquer ser vivo. Devido a isso, a qualidade do solo é essencial na agricultura para que haja a produção de alimentos de boa qualidade e para a manutenção das mais variadas espécies. Como afirmado por PARIKH (2012) no decorrer da história da humanidade, a nossa relação com o solo afetou nossa habilidade do cultivo de culturas e influenciou o sucesso de civilizações; a relação entre humanos, a terra e fontes de alimentos confirma o solo como a base da agricultura.

O conceito de qualidade do solo é amplo, uma vez que as atividades antropogênicas de manejo influenciam diretamente o ambiente em questão (RAMOS et al., 2015; SOUZA; FAVARATO, 2015). De acordo com VALARINI et al. (2011), o solo é um sistema heterogêneo, descontínuo e estruturado, formado por microhabitats com diferentes características químicas, físicas e biológicas altamente interdependentes. De modo que indiferente ao sistema de produção utilizado, as tecnologias agrícolas baseadas em monocultivos, a utilização inadequada de agrotóxicos e de fertilizantes químicos e orgânicos, o uso intensivo de máquinas pesadas e a manutenção do solo descoberto podem afetar, em geral negativamente, a qualidade do solo por mudanças nas propriedades físicas, químicas e biológicas (VALARINI et al., 2011).

A qualidade do solo pode ser considerada um dos fatores chave necessários para se atingir sustentabilidade de um sistema de produção, onde se destaca o manejo do solo empregado como o principal componente para ser obter uma produção sustentável (LOSS et al., 2009; SOUZA; FAVARATO, 2015). Dessa maneira, o uso de composto orgânico é uma das formas que tem sido propostas com sucesso em muitos casos no âmbito de se atingir a sustentabilidade de um sistema de produção agrícola (SOUZA; FAVARATO, 2015; WEI et al., 2015; SCOTTI et al., 2016). Através de alguns estudos, já relatados em literatura, é possível verificar que a compostagem é um processo econômico, eficiente e muito importante para estabilização e reciclagem de resíduos na agricultura (MARTINS et al., 2013; MEDINA et al., 2015; SCOTTI et al., 2016). Com isso o composto orgânico sendo utilizado como adubo, é uma boa forma de se obter melhores resultados na produção. Além de melhorar a qualidade química, física e biológica do solo, devido principalmente ao aporte de carbono ao sistema, a utilização de composto orgânico auxilia nas necessidades nutricionais da planta (GOMIERO; PIMENTEL; PAOLETTI, 2011). Isso porque vários resíduos orgânicos que auxiliam no aporte de carbono do sistema podem ser utilizados no processo de compostagem, como por exemplo, folhas vegetais, esterco animal, carcaça animal, restos de frutas, vinhaça, torta de filtro, lodo de esgoto, dentre outros (KALBASI-ASHTARI et al., 2005; ZHANG et al., 2008; WEI et al., 2015; HAMM et al., 2016).

Portanto, em se tratando do aspecto nutricional do solo, a ciclagem de nutrientes que ocorre do solo para as plantas e animais, e então retorna ao solo através do processo de decomposição da biomassa, auxilia na manutenção dos nutrientes essenciais para crescimento das plantas no solo (PARIKH, 2012). De modo geral, há necessidade de 16 elementos essenciais nesse habitat para desenvolvimento das plantas, sendo os macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), enquanto os micronutrientes são o boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn); além da necessidade de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) (CARRIJO et al., 2004). O teor de matéria orgânica do solo também é crucial para fertilidade, fornecendo além de nutrientes essenciais para a planta, uma melhoria na capacidade de reter água e aeração do mesmo (PARIKH, 2012).

Além dos benefícios nutricionais fornecidos ao solo através de adubação mineral e orgânica, vale ressaltar também a importância dos micro-organismos no solo, uma vez que do ponto de vista agrônomo, eles auxiliam na manutenção do equilíbrio do solo, controle de micro-organismos patogênicos, disponibilizando nutrientes, decompondo matéria orgânica e/ou produzindo compostos úteis (CARRIJO et al., 2004; GOMIERO; PIMENTEL; PAOLETTI, 2011). Há uma elevada diversidade de arqueias, bactérias e fungos auxiliando nos processos de ciclagem de nutrientes e os mesmos possuem grande potencial como indicadores da qualidade do solo por estarem intimamente associados aos processos ecológicos (VAL-MORAES et al., 2011; FIGUEIREDO, 2015). Como exemplo, dentre os micro-organismos mais estudados em agricultura há os do gênero *Rhizobium*, que realizam o processo de fixação de nitrogênio em leguminosas (CASTELLANE; LEMOS, 2007; DE SOUZA et al., 2012).

Pode-se citar também a bactéria não-patogênica *Bacillus megaterium*, que vem sendo utilizada industrialmente por volta de 50 anos, pois possui uma elevada capacidade de produzir exoenzimas muito úteis para indústria farmacêutica e também agroindústria (VARY et al., 2007; EPPINGER et al., 2011). Há também as bactérias solubilizadoras de fosfato, no qual promovem a disponibilização de fosfato para as plantas, e conseqüentemente auxiliam no crescimento das mesmas (POONGUZHALI; MADHAIYAN; SA, 2008). Em um estudo realizado por RODRÍGUEZ et al. (2007), a inoculação do solo com bactérias solubilizadoras de fosfato demonstrou uma melhor absorção do fósforo pelas plantas, devido à produção bacteriana de enzima extracelular e/ou exsudação de ácidos orgânicos que contribuem para a solubilização de fósforo e para a estimulação do crescimento dos vegetais.

2.2 Aspectos físicos, químicos e microbiológicos da água para a agricultura

Na sociedade, a água tem uma importância única na vida de todos os organismos, sejam eles procarióticos ou eucarióticos. Quase toda água do planeta está concentrada nos oceanos, e, uma pequena fração está disponível

ao homem e a todos os outros organismos, portanto, é importante preservar e cuidar da qualidade dos ecossistemas aquáticos.

A agricultura é uma das atividades social e econômica que se tornou indispensável para a humanidade. Devido a isso, a utilização de água para fins de irrigação tornou-se uma prioridade, o que acarretou o desenvolvimento de práticas agrícolas próximas a rios, lagos e córregos (CARVALHO; SCHLITTLER; TORNISIELO, 2000). A irrigação representa o uso mais intenso dos recursos hídricos, sendo responsável por aproximadamente 70% do consumo de água doce do mundo (BRAGA et al., 2005).

Um dos principais usos da água é a irrigação, e isso requer que a água esteja isenta de patógenos, substâncias tóxicas e não possua excesso de nutrientes nitrogenados e fosfatados, principalmente (BRAGA et al., 2005; ESTEVES, 2011). A qualidade da água é, portanto, essencial para se obter êxito em sistemas irrigados, por isso há necessidade de monitoramento e avaliação da qualidade da água utilizada para tal uso, afim de se evitar problemas de contaminação dos alimentos irrigados e consequentemente da população consumidora (SETTI et al., 2001; BRAGA et al., 2005).

Na agricultura, um dos aspectos mais importantes da produção de hortaliças é a qualidade do alimento produzido, estando isso, intrinsecamente relacionado com a água utilizada nas irrigações, que uma vez fora dos padrões compromete o alimento produzido, danifica o sistema de irrigação, além de impactar negativamente o ambiente (DAHAN et al., 2014; DE MESQUITA et al., 2015; CANTU et al., 2016). De modo geral, em horticultura, a deficiência de água é normalmente, o fator mais limitante na obtenção de produtividades elevadas e produtos de boa qualidade, entretanto o excesso também é prejudicial; uma vez que as hortaliças possuem seu desenvolvimento intensamente influenciado pelas condições de umidade do solo (MAROUELLI; SILVA; DA SILVA, 1996).

Em se tratando dos parâmetros físicos e químicos de qualidade de água doce, as variáveis físicas cor, sólidos, temperatura, transparência e turbidez e as variáveis químicas cloreto (Cl^-), oxigênio dissolvido (OD), potencial de oxidação-redução, sólidos totais dissolvidos, fósforo total, ortofosfato solúvel, nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), nitrogênio amoniacal (amônia e amônio), condutividade elétrica, pH, demanda química de oxigênio (DQO) e metais (Cu, Zn, Cr, Cd, Ni, Pb, por exemplo) são as medidas mensuráveis para se obter padrões de qualidade

(CONAMA 357/2005, 2005). Em razão dessas variáveis, principalmente das químicas, é possível determinar o grau de contaminação, caracterizar os picos de concentração dos efluentes tóxicos e avaliar simultaneamente o equilíbrio bioquímico necessário à manutenção da vida aquática (BRAGA et al., 2005; CÉLICO, 2015).

Além disso, vale ressaltar também a importância do monitoramento e controle da qualidade de água no que diz respeito à questão microbiológica, uma vez que pode haver o carreamento de patógenos através dos recursos hídricos. Dentre esses micro-organismos os coliformes fecais podem estar presentes e os mesmos apresentam os mais graves riscos para a saúde humana e animal, podendo causar inclusive problemas respiratórios (NEWTON et al., 2013). Um dos indicadores usualmente utilizados para se detectar contaminação fecal é a presença da bactéria *Escherichia coli* (FIELD; SAMADPOUR, 2007). Entretanto nos ecossistemas há inúmeras maneiras de contaminação fecal e a utilização de métodos baseados em cultivo não conseguem discriminar entre as diferentes fontes possíveis, dificultando assim as decisões de direcionar esforços no âmbito de controle da poluição e mesmo avaliar quais os riscos do ambiente para saúde humana e animal (NEWTON et al., 2013; HUANG et al., 2014). Porém devido ao custo de implementação de novos métodos mais precisos de detecção de patógenos, atualmente a presença de coliformes totais e *E. coli* são os indicativos microbiológicos mais utilizados e propostos para análise de qualidade de água.

Em condições físicas e químicas apropriadas no ambiente aquático, uma cadeia alimentar composta por organismos produtores, consumidores de várias ordens e decompositores irão surgir. E com isso, além do papel desempenhado por esses organismos no meio aquático, eles também são importantes como fonte de alimento para o homem, por sua atuação na recuperação da qualidade das águas poluídas e pela introdução e retirada de gases presentes na atmosfera e na hidrosfera. Além de contribuírem com a ocorrência de uma série de doenças (BRAGA et al., 2005)

Os micro-organismos presentes na água possuem importante interação na cadeia alimentar, envolvidos diretamente com o processo chamado alça microbiana (*microbial loop*), no qual foi descrito por AZAM et al. (1983). A alça microbiana é o fluxo de carbono que passa pela teia trófica microbiana em que

o carbono orgânico dissolvido é agregado a níveis tróficos superiores através da sua incorporação na biomassa bacteriana que subsidia a cadeia alimentar clássica formada pelo fitoplâncton-zooplâncton-peixe. A conexão trófica entre bactérias e a cadeia trófica clássica ocorre por intermédio de nanoflagelados, ciliados e outros membros do micropilâncton, que se alimentam de picoplâncton (plâncton < 3 µm geralmente formado por bactérias heterotróficas e pequenas cianobactérias). Estes consumidores são por sua vez depredados por zooplâncton maior, que permite uma transferência de energia da teia alimentar microbiana na cadeia alimentar clássica. Deste modo, os diferentes compartimentos da teia trófica microbiana são integrados na alça microbiana. Ainda de acordo com os autores, uma importante consequência desse processo, decorre da habilidade das bactérias absorverem os nutrientes contidos na água, ocorrendo uma rápida reciclagem desses nutrientes no meio (AZAM et al., 1983). De acordo com FENCHEL (2008), o principal efeito da alça microbiana sobre a ciclagem dos elementos na coluna de água é que ele acelera a mineralização e então regenera a produção em sistemas limitados de nutrientes, portanto, o processo predomina em sistemas oligotróficos.

Com isso percebe-se a importância dos micro-organismos na manutenção dos sistemas aquáticos. Uma vez que para o ambiente estar em equilíbrio e a microbiota lá presente desempenhar seu papel no fluxo de energia e degradação de compostos, os micro-organismos devem estar agindo de forma conjunta. Entretanto além das alterações naturais do ambiente, sabe-se da interferência antropogênica nos sistemas aquáticos causando assim uma mudança maior no microbioma devido alterações na concentração de nutrientes (ELSER et al., 2007; MENEGHINE et al., 2015; NEWTON; MCLELLAN, 2015), por exemplo, causando assim certos danos no equilíbrio natural. Como outro exemplo pode-se citar a questão dos ciclos biogeoquímicos, onde se sabe que o sistema de interação de reações biogeoquímicas é altamente complexo, pobremente caracterizado e é mediado por vários micro-organismos ainda não conhecidos, entretanto há também o fato que os ciclos estão altamente susceptíveis à perturbação humana (MADSEN, 2011).

Dentre as alterações antropogênicas que podem ocorrer nos sistemas aquáticos está a eutrofização. A eutrofização que também é um processo considerado natural que pode levar anos para ocorrer, entretanto esse processo

ocorre de maneira mais rápida devido a ação antropogênica (ESTEVES, 2011). Algumas das maiores causas da eutrofização são devido ao descarte de efluentes comerciais, industriais e agrícolas nos sistemas aquáticos, podendo-se citar também efluentes de sistemas de criação de organismos aquáticos (TANG et al., 2009; MACEDO; SIPAÚBA- TAVARARES, 2010; TAVARES; SANTEIRO, 2013).

2.3 Ciclos biogeoquímicos

Biogeoquímica é a disciplina que se empenha para entender processos complexos, geralmente realizados por micro-organismos, que transformam e reciclam tanto substâncias orgânicas quanto inorgânicas em solos, sedimentos e águas (MADSEN, 2011). Esses processos são catalisados em sua maioria por bactérias e arqueias, e mantém a biosfera em equilíbrio (MADSEN, 2011; LEVY-BOOTH; PRESCOTT; GRAYSTON, 2014).

Os micro-organismos são fundamentais para diversas funções em todos os ecossistemas existentes. Eles estão diretamente relacionados com o equilíbrio do ambiente estudado, e conseqüentemente se há alteração da diversidade microbiana há uma direta perturbação no ambiente, afetando diversas funções extremamente importantes, como por exemplo, os ciclos do carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo.

O carbono é o elemento central de todas as moléculas orgânicas, sendo, portanto, um dos elementos mais abundantes na natureza. De maneira geral, o ciclo do carbono ocorre por meio de todos os principais reservatórios de carbono da Terra, desde a atmosfera em si até a biomassa. O maior reservatório de carbono encontra-se nos sedimentos e rochas da crosta terrestre, contudo, o tempo necessário para sua reciclagem é tão longo que sua transferência desse compartimento é relativamente insignificante em uma escala humana (MADIGAN et al., 2010). O mecanismo mais rápido de transferência global do carbono ocorre por intermédio do CO₂ atmosférico, que é removido da atmosfera principalmente pela fotossíntese das plantas terrestres e micro-organismos marinhos, sendo devolvido à atmosfera por meio da respiração de animais e micro-organismos quimiorganotróficos (ADUAN; VILELA; REIS JÚNIOR, 2004).

A contribuição mais importante do CO₂ para a atmosfera é a decomposição microbiana da matéria orgânica morta.

Outro elemento de grande importância e abundância na atmosfera é o nitrogênio (N). Este elemento é essencial em todos os tecidos vivos, uma vez que é constituinte de aminoácidos, bases nitrogenadas, hormônios, cofatores, pigmentos, dentre outros (ADUAN; VILELA; REIS JÚNIOR, 2004; NELSON; COX, 2014). Além disso, o nitrogênio é um dos mais importantes elementos limitantes da produtividade do ambiente na grande maioria dos ecossistemas terrestres, marinhos e de água doce (HOWARTH et al., 1988; DODDS et al., 2004; ELSER et al., 2007). Como já mencionado na literatura por vários pesquisadores, a fixação biológica de nitrogênio é essencial para a vida, sendo um dos processos mais importantes na Terra, já que o N₂ atmosférico inerte é reduzido para amônia biodisponível (JOHNSTON; LI; OGILVIE, 2005; MADSEN, 2011; ANDREOTE et al., 2012; BELLENGER et al., 2014). Atualmente, sabe-se que esse processo é catalisado por pelo menos três nitrogenases (*nifHDK*) geneticamente distintas mas relacionadas em sua evolução (RUBIO; LUDDEN, 2008; BOYD; HAMILTON; PETERS, 2011). Na tabela 1, estão sumarizadas as principais etapas do processo do ciclo de nitrogênio e também exemplos de micro-organismos que dele participam.

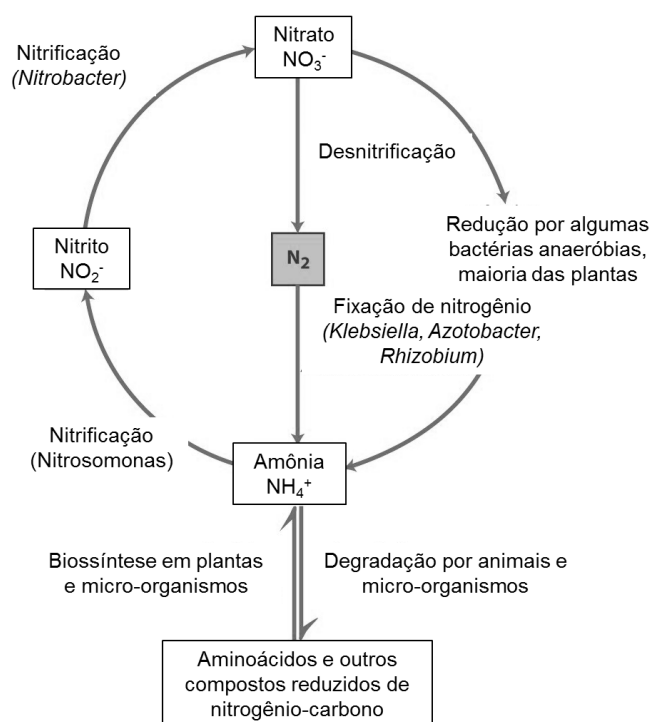


Figura 1. Esquema dos processos essenciais e procariotos no ciclo do nitrogênio. Fonte: adaptado de (NELSON; COX, 2014).

O fósforo (P) é outro elemento considerado essencial e indispensável para os seres vivos, uma vez que é constituinte de ácidos nucleicos (DNA e RNA), ocorre nos fosfolípidos de membranas celulares e ATP. O ciclo global do P é peculiar entre os grandes ciclos biogeoquímicos, uma vez que esse elemento não produz, em nenhum momento, qualquer substância volátil em quantidades relevantes (ADUAN; VILELA; REIS JÚNIOR, 2004). Entretanto, juntamente com o nitrogênio, o fósforo acaba sendo outro dos mais importantes elementos limitantes da produtividade nos ambientes na grande maioria dos ecossistemas marinhos e de água doce. Em excesso o fósforo e o nitrogênio levam à eutrofização de vários ecossistemas aquáticos, com consequente perda na produção, e um longo período de tempo para gerenciar possíveis métodos de recuperação da área degradada (FILIPPELLI, 2008; MACEDO; SIPAÚBA-TAVARARES, 2010; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2013).

Alterações no ciclo do fósforo foram ocorrendo com o passar dos anos, onde no passado, a maior parte do fósforo era oriunda apenas do intemperismo de minerais à base de fosfato de cálcio; havendo também redistribuição do fósforo através das eras glaciais, resultando na quantidade de fósforo reativo nos níveis do mar (ADUAN; VILELA; REIS JÚNIOR, 2004; FILIPPELLI, 2008). Entretanto, de maneira geral, em ambientes agrícolas a maior parte do fósforo está limitada quando se compara com outros nutrientes, com isso há um grande uso de fertilizantes fosforados. Devido a isso, há atualmente o chamado novo ciclo do fósforo terrestre, pois é dominado pela agricultura e atividade humana, o que tem dobrado a carga de fósforo nos ambientes, principalmente lagos e áreas costeiras, devido ao uso de fertilizantes, desflorestamento e erosão de solos, e fontes de esgoto doméstico; ocasionando assim eutrofização dos ecossistemas em questão (FILIPPELLI, 2008).

Contudo, apesar da fertilização do fósforo com diferentes tipos de adubos, isso não garante que o elemento será realmente aproveitado pelos vegetais, pois muitos deles se precipitam em formas insolúveis, dependendo da acidez do solo; havendo também a competição do fósforo pelos micro-organismos e não apenas os vegetais (GYANESHWAR et al., 2002). Porém, apesar da competição por fósforo pelas bactérias, existem algumas espécies que são capazes de melhorar a disponibilidade do nutriente, causando a mobilização do fosfato insolúvel no solo, e aumentando assim o crescimento da planta em solos com baixa

disponibilidade de fósforo (TRIPURA; SASHIDHAR; PODILE, 2007; BANERJEE et al., 2010). Com isso, a inoculação do solo com bactérias solubilizadoras de fosfato mostra melhor absorção do fósforo pelas plantas, devido à produção bacteriana de enzima extracelular e exsudação de ácidos orgânicos com possível estimulação do crescimento da planta (RODRÍGUEZ et al., 2007; SACCO, 2013).

O enxofre (S) é um elemento essencial para a vida, é encontrado em vitaminas e como componente dos aminoácidos cisteína e metionina. O metabolismo de compostos orgânicos de enxofre, possui, portanto, função importante no ciclo global do enxofre. Assim como acontece com os outros elementos, o enxofre sofre transformações pela ação dos micro-organismos e as mesmas são ainda mais complexas do que aquelas do nitrogênio, devido à variedade de estados de oxidação do enxofre e pelo fato de várias transformações do enxofre ocorrer abioticamente (Figura 2) (MADIGAN et al., 2010; MADSEN, 2011).

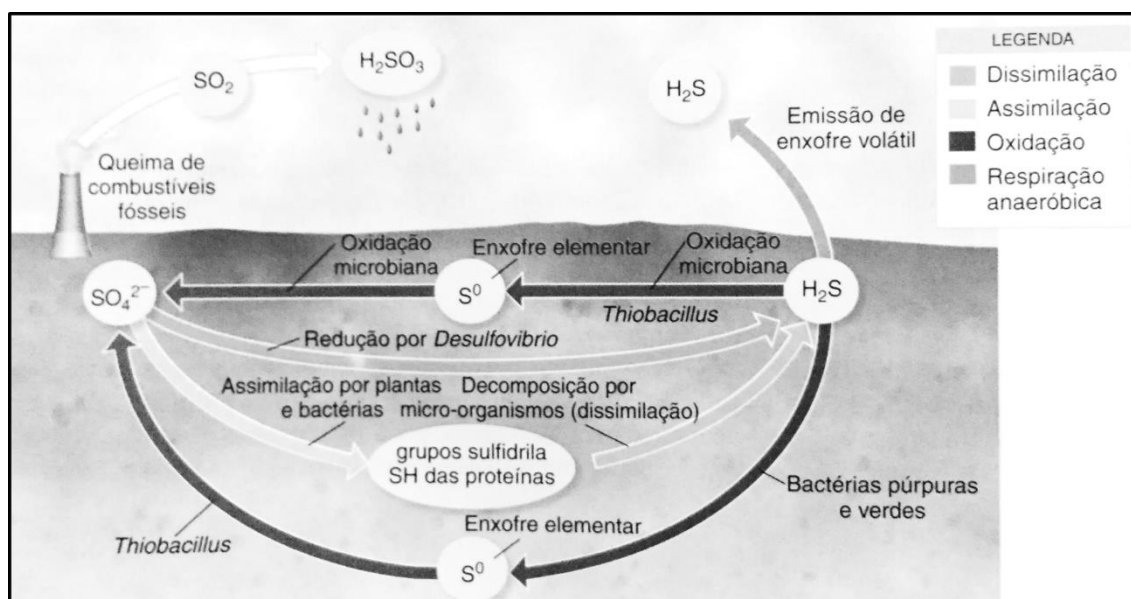


Figura 2. Esquema dos processos bioquímicos envolvidos no ciclo do enxofre. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE (2012).

O enxofre ocorre em vários estados de oxidação, possuindo -2 (sulfito e enxofre orgânico reduzido), 0 (enxofre elementar, S^0) e +6 (sulfato) sendo este último o mais encontrado na natureza. Especialmente as bactérias redutoras de sulfato e as bactérias oxidantes de sulfito tem um importante papel nas configurações do meio ambiente e também na indústria. Uma vez que, em alguns

casos a atividade dessas bactérias causam sérios problemas ambientais ou industriais, sob grande cuidado e condições controláveis podem resolver outros problemas das mesmas áreas citadas, especialmente os relacionados às indústrias de petróleo e mineradoras (TANG; BASKARAN; NEMAT, 2009). Atualmente, o uso de bactérias acidofílicas, quimiolitotróficas capazes de oxidar ferro e enxofre em processos industriais para recuperação de metais em minas contendo Cu, Au and U está bem estabelecido biotecnologicamente com vantagens distintas sobre mineração tradicional; há um consórcio de diferentes micro-organismos (como por exemplo, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans*) participando das reações de oxidação que resultam na extração dos metais dissolvidos do minério (VALENZUELA et al., 2006; CIFTCI; AKCIL, 2013).

De modo geral, as bactérias oxidantes de enxofre e sulfeto produzem sulfato, enquanto as bactérias redutoras de sulfato consomem o sulfato, produzindo sulfeto de hidrogênio. Devido ao fato de o sulfeto ser tóxico e também reagir com vários metais, a redução do sulfato é um importante processo biogeoquímico (TANG; BASKARAN; NEMAT, 2009; MADIGAN et al., 2010). Dessa maneira tem-se que a redução biológica do sulfato pode ser assimilatória, onde o sulfato reduzido será incorporado pelos micro-organismos como fonte de nutriente, sendo o enxofre utilizado na biossíntese de biomoléculas; e dissimilatória, onde sob condições anaeróbias os micro-organismos utilizam o sulfato como acceptor final de elétrons no sistema de transporte de elétrons (BARRIE JOHNSON; HALLBERG, 2009).

2.4 Exopolissacarídeos bacterianos

Os polissacarídeos microbianos têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de uso em uma ampla variedade de áreas industriais (como indústrias farmacêuticas, cosméticos, alimentos) e também ambiental (recuperação/adsorção de metais, recuperação de óleos), podendo ser aplicados como emulsificantes, estabilizantes, geleificantes, lubrificantes ou biofilmes (SUTHERLAND, 1999; SHAH et al., 2008; SATPUTE et al., 2010; CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014). Dentre eles, destacam-se os exopolissacarídeos (EPS).

Os EPS são polissacarídeos, sendo constituintes normais de todas as células microbianas, incluindo as bactérias, leveduras e fungos. Este biopolímero é uma goma hidrossolúvel que possui propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes (SUTHERLAND, 2001). Eles são metabólitos secundários produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, podendo ser homopolímeros ou heteropolímeros que geralmente são característicos de grupos de micro-organismos (SUTHERLAND, 1999).

Tanto organismos eucarióticos como procariotos produzem grupos de EPS representativos, variando nas concentrações e natureza das moléculas, mas bactérias produzem uma diversidade maior de moléculas e também, geralmente, quantidades maiores que 10g L^{-1} (DONOT et al., 2012).

Há um grande número de bactérias conhecidas que produzem quantidades abundantes de EPS, como *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Beijerinckia* e *Azotobacter* (VERMANI; KELKAR; KAMAT, 1995; CASTELLANE et al., 2015; SACCO et al., 2015). Porém, a maioria é patogênica, dificultando às vezes o processo de manipulação das mesmas devido à normas de biossegurança.

Os exopolissacarídeos de *Xanthomonas campestris* (xantana), *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* (gelana) e *Acetobacter xylinum* (celulose) estão sendo comercializados (SUTHERLAND, 2001). Dos polímeros de origem bacteriana, a goma xantana tem sido a mais estudada, uma vez que seu uso em alimentos foi permitido pela FDA (“Food and Drug Administration”), desde julho de 1969.

Outro tipo de EPS bem estudado são aqueles do gênero *Rhizobium* (CASTELLANE et al., 2015; MORETTO et al., 2015), os mesmos sintetizam grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares, gastando mais de 70% de sua energia na produção (GONZÁLEZ; REUHS; WALKER, 1996).

Com relação à biossíntese de EPS, há relatos extensivos sobre estudos genéticos com a bactéria *Sinorhizobium meliloti*, onde conseguiu-se identificar diversos reguladores da síntese de dois tipos de biopolímeros (EPS I e EPS II) por ele produzido, dessa maneira, atualmente, conhece-se bem a biossíntese dos nucleotídeos de açúcar e montagem das unidades repetitivas (MOREIRA et al., 2000; SKORUPSKA et al., 2006). Entretanto, os passos finais da sua biossíntese ainda não estão muito bem caracterizados. Além disso, produtos de

genes homólogos envolvidos na regulação da síntese de EPS de outras espécies microbianas também têm sido identificados (SKORUPSKA et al., 2006). Como exemplo, pode-se citar que a levana, pululana, curdlana e xantana são os principais EPS conhecidos, e são obtidos através das bactérias *Zyomonas mobilis* e *Bacillus sp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Aureobasidium pullulans* e *Alcaligenes faecalis*, *Xanthomonas campestris*, respectivamente. As vias biossintéticas desses quatro EPS citados, bem como os fatores que influenciam estas vias, são representativas dos mecanismos de produção microbiana dos EPS (DONOT et al., 2012).

Referências relativas à genética da biossíntese de EPS são diferentes e, geralmente, referem-se a um produto específico ou uma produção de um micro-organismo específico. As cepas microbianas não costumam produzir substâncias puras, mas muitas vezes produzem uma mistura de polímeros cuja síntese envolve vários grupos de genes (VAN KRANENBURG et al., 1999; HAY et al., 2010; DONOT et al., 2012). No caso do alginato, há 24 genes identificados em *Pseudomonas aeruginosa* envolvidos na produção (HAY et al., 2010). Na biossíntese de succinoglicano a partir de espécies de *Rhizobium* há cerca de 30 genes envolvidos, no caso, o mecanismo genético deste EPS é o mais estudado (SUTHERLAND, 2001).

Recentemente, muitos polímeros microbianos, como os EPS, têm sido usados como bioemulsificantes devido sua habilidade de estabilizar emulsões entre água e compostos hidrofóbicos (FREITAS et al., 2009). Moléculas bioemulsificantes tem recebido maior atenção na comunidade científica por causa de suas vantagens sob compostos sintéticos, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, aumento de espuma, seletividade, alta atividade específica em temperaturas extremas, pH e salinidade (ABOUSEOUD et al., 2008). Devido as características dos EPS e também importância dos bioemulsificantes, estes são adequados para várias aplicações relacionadas ao meio ambiente, como por exemplo, auxílio na biodegradação e bioemulsificação de hidrocarbonetos, agentes gelificantes, estabilizantes (ABOUSEOUD et al., 2008; MNIF; GHRIBI, 2015).

Porém apesar da grande aplicação dos EPS no setor alimentício, agroindústria e ambiental, em muitos casos, os genes envolvidos nas etapas de biossíntese ainda não são muito bem conhecidos. Isso porque há diferentes

genes responsáveis pela biossíntese de EPS nos diferentes micro-organismos conhecidos. Percebendo-se assim a importância de se voltar estudos iniciais de prospecção voltados a esses produtos.

2.5 Metagenômica

Em se tratando de ecologia microbiana, um dos pontos limitantes da microbiologia clássica é o isolamento dos micro-organismos, uma vez que não se conhece um meio de cultura universal contendo todos os fatores requeridos pela maioria dos micro-organismos existentes no ambiente (HANDELSMAN, 2004). Além disso, como é conhecido em microbiologia clássica, consegue-se isolar em placas apenas em torno de 1% do total de micro-organismos presentes no ambiente. Com isso, o estudo da real biodiversidade de bactérias em determinado ambiente se torna impossível de se obter. Entretanto com o avanço da microbiologia, genética e biologia molecular, novas técnicas de análise foram surgindo, como a metagenômica, e assim estudos em ecologia microbiana tiveram um grande avanço, tanto na compreensão da biodiversidade e como no conhecimento dos processos microbianos dos ambientes (THOMAS, GILBERT, MEYER, 2012).

A metagenômica foi desenvolvida com o intuito de auxiliar os métodos de microbiologia clássica a entender melhor a diversidade de micro-organismos nos ambientes, uma vez que há evidências de que a grande maioria dos micro-organismos presentes no planeta Terra não são cultiváveis (HANDELSMAN, 2004). Essa técnica oferece um caminho para acessar de forma mais completa a diversidade de micro-organismos presentes do ambiente em análise, permitindo executar estudos de genômica funcional dos membros de sua microbiota, sem a necessidade do cultivo de micro-organismos.

Atualmente, com o desenvolvimento das novas tecnologias de sequenciamento de DNA (BUERMANS; DEN DUNNEN, 2014; ROTHBERG et al., 2011), estudos metagenômicos tem se tornado chave no entendimento da microbiota dos ambientes e também a função dos micro-organismos no local de estudo. Através dessas novas tecnologias de sequenciamento há a geração de uma grande quantidade de dados em um curto espaço de tempo (THOMAS;

GILBERT; MEYER, 2012). Desse modo, a metagenômica é uma abordagem promissora que além de permitir estudos da diversidade microbológica de um ambiente sem o isolamento desses (MENDES et al., 2014; SCHREIER; MIRZOYAN; SAITO, 2010), ainda permite acessar o genoma desses organismos incultiváveis, oferecendo a oportunidade de recuperação de genes desconhecidos que estão diretamente envolvidos na biossíntese de inúmeros compostos ou envolvidos na degradação de xenobióticos (MARTINS et al., 2013; MIRETE; MORGANTE; GONZÁLEZ-PASTOR, 2016). Desse modo a descoberta ou o isolamento de diversos genes pode auxiliar no desenvolvimento de diversos produtos na área biotecnológica envolvidos na sustentabilidade do planeta.

Com as abordagens genômicas uma mudança sobre a perspectiva microbiana envolvendo estrutura, função e ecologia tem se revelado extremamente importante. Através das tecnologias de sequenciamento de nova geração (Illumina, Ion Proton, Ion Torrent, Nanopore, por exemplo) aliadas com ferramentas de bioinformática e estatística para análise das sequências de DNA, atualmente se consegue obter caracterizações de populações microbianas diretamente de qualquer amostra ambiental. São exemplos, composto orgânico (MARTINS et al., 2013), solo sob diferentes cultivos e manejos (MENDES et al., 2014; NIELSEN et al., 2014), algas marinhas (ZOZAYA-VALDÉS; ROTH-SCHULZE; THOMAS, 2016) e água doce (EILER; BERTILSSON, 2004; GHAI et al., 2011).

De acordo com o exposto vale ressaltar a metagenômica como importante ferramenta na compreensão das comunidades microbianas, desde o estudo da biodiversidade e características funcionais até a prospecção de genes de interesse biotecnológico. Contudo, no Brasil, estudos metagenômicos em ecossistemas de água doce são escassos e com isso há um gap de informações sobre a comunidade microbiana brasileira em diferentes habitats, possuindo informações em sua grande maioria apenas sobre solos.

Referências bibliográficas

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, Amsterdam, v. 223, n. 1–3, p. 143–151, 2008.

ADUAN, R. E.; VILELA, M. D. F.; REIS JÚNIOR, F. B. D. R. **Os Grandes ciclos biogeoquímicos do planeta**. Planaltina: Embrapa: Cerrados, 2004. 25 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 119).

ANDREOTE, F. D.; JIMÉNEZ, D. J.; CHAVES, D.; DIAS, A. C. F.; LUVIZOTTO, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; LOPEZ, M. V.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; DE MELO, I. S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2012.

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J. G.; GRAY, J. C.; MEYER-REIL, L. A.; THINGSTAD, F. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 10, n. 3, p. 257–264, 1983.

BANERJEE, S.; PALIT, R.; SENGUPTA, C.; STANDING, D. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. **Australian Journal of Crop Science**, Adelaide, v. 4, n. 6, p. 378–383, 2010.

BARRIE JOHNSON, D.; HALLBERG, K. B. Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms. **Advances in microbial physiology**, Londres, v. 54, p. 201–55, 2009.

BELLENGER, J. P.; XU, Y.; ZHANG, X.; MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L. Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 69, p. 413–420, 2014.

BOYD, E. S.; HAMILTON, T. L.; PETERS, J. W. An Alternative Path for the Evolution of Biological Nitrogen Fixation. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 2, p. 1-11, 2011.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. G. L.; MIERZWA, J. C.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à engenharia ambiental**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. p. 318.

BUERMANS, H. P.; DUNNEN, J. T. Next generation sequencing technology: advances and applications. **Biochimica et biophysica acta (BBA) – Molecular basis of disease**, v. 1842, n. 10, p. 1932-1941, 2014.

CANTU, R. R.; HARO, M. M.; MORALES, R. G. F.; VISCONTI, A.; SCHALLENBERGER, E. Qualidade da água utilizada na irrigação de hortaliças na região do litoral norte de Santa Catarina. **Revista de Estudos Ambientais**, Blumenau, v. 17, n. 2, p. 41-50, 2016.

CARRIJO, O. A.; SOUZA, R. B. De; MAROUELLI, W. A.; ANDRADE, R. J. de. **Fertirrigação de hortaliças**. Brasília: Embrapa. 2004. 13 p. (Embrapa. Circular Técnica 32).

CARVALHO, A. R.; SCHLITTLER, F. H. M.; TORNISIELO, V. L. Relações da atividade agropecuária com parâmetros físicos químicos da água. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 618–622, 2000.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. de M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 10, p. 1503–1506, 2007.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. de M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate polymers**, Barking, v. 111, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; DE MACEDO LEMOS, E. G. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International journal of biological macromolecules**, Guildford, v. 74, p. 515–522, 2015.

CÉLICO, A. S. **Influência da adubação orgânica na qualidade da água destinada à irrigação de hortaliças**. 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

CIFTCI, H.; AKCIL, A. Biohydrometallurgy in Turkish gold mining: First shake flask and bioreactor studies. **Minerals Engineering**, Oxford, v. 46–47, p. 25–33, 2013.

CONAMA 357/2005. **Conselho Nacional de Meio Ambiente - Resolução N° 357 de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

DAHAN, O.; BABAD, A.; LAZAROVITCH, N.; RUSSAK, E. E.; KURTZMAN, D. Nitrate leaching from intensive organic farms to groundwater. **Hydrology and Earth System Sciences**, Göttingen, v. 18, n. 1, p. 333–341, 2014.

DE MESQUITA, D. R.; DA SILVA, J. P.; PESSOA DO MONTE, N. D.; TORRES DE SOUSA, R. L.; DE SOUSA SILVA, R. V.; OLIVEIRA, S. S.; DA SILVA LEAL, A. R.; FREIRE, S. M. Ocorrência de parasitos em alface-crespa (*Lactuca sativa* L.) em hortas comunitárias de Teresina, Piauí, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 1, p. 67–76, 2015.

DE SOUZA, J. A. M.; TIEPPO, E.; DE SOUZA MAGNANI, G.; ALVES, L. M. C.; CARDOSO, R. L.; CRUZ, L. M.; DE OLIVEIRA, L. F.; RAITTZ, R. T.; DE SOUZA, E. M.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F.; DE MACEDO LEMOS, E. G. Draft genome sequence of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium elkanii* 587. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 13, p. 3547–3548, 2012.

DODDS, W. K.; MARTÍ, E.; TANK, J. L.; PONTIUS, J.; HAMILTON, S. K.; GRIMM, N. B.; BOWDEN, W. B.; MCDOWELL, W. H.; PETERSON, B. J.; VALETT, H. M.; WEBSTER, J. R.; GREGORY, S. Carbon and nitrogen stoichiometry and nitrogen cycling rates in streams. **Oecologia**, Berlim, v. 140, n. 3, p. 458–467, 2004.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012.

ELSER, J. J.; BRACKEN, M. E. S.; CLELAND, E. E.; GRUNER, D. S.; HARPOLE, W. S.; HILLEBRAND, H.; NGAI, J. T.; SEABLOOM, E. W.; SHURIN, J. B.; SMITH, J. E. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, n. 12, p. 1135–1142, 2007.

EPPINGER, M.; BUNK, B.; JOHNS, M. A.; EDIRISINGHE, J. N.; KUTUMBAKA, K. K.; KOENIG, S. S. K.; CREASY, H. H.; ROSOVITZ, M. J.; RILEY, D. R.; DAUGHERTY, S.; MARTIN, M.; ELBOURNE, L. D. H.; PAULSEN, I.; BIEDENDIECK, R.; BRAUN, C.; GRAYBURN, S.; DHINGRA, S.; LUKYANCHUK, V.; BALL, B.; UL-QAMAR, R.; SEIBEL, J.; BREMER, E.; JAHN, D.; RAVEL, J.; VARY, P. S. Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 193, n. 16, p. 4199–213, 15 ago. 2011.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 790 p.

FENCHEL, T. The microbial loop - 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Amsterdam, v. 366, n. 1–2, p. 99–103, 2008.

FIELD, K. G.; SAMADPOUR, M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water research*, New York, v. 41, n. 16, p. 3517–38, 2007.

FIGUEIREDO, B. P. **Efeito do adubo orgânico na diversidade bacteriana de solos**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

FILIPPELLI, G. M. The global phosphorus cycle: past, present, and future. *Mineralogical Society of America*, Vancouver, p. 89–95, 2008.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. a M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 78, n. 3, p. 549–556, 2009.

GOMIERO, T.; PIMENTEL, D.; PAOLETTI, M. G. Environmental impact of different agricultural management practices: conventional vs. organic agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Londres, v. 30, n. 1–2, p. 95–124, 2011.

GONZÁLEZ, J. E.; REUHS, B. L.; WALKER, G. C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 93, n. 16, p. 8636–41, 1996.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, Haia, v. 245, n. 1, p. 83–93, 2002.

HAMM, A. C.; TENUTA, M.; KRAUSE, D. O.; OMINSKI, K. H.; TKACHUK, V. L.; FLATEN, D. N. Bacterial communities of an agricultural soil amended with solid pig and dairy manures, and urea fertilizer. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 103, p. 61–71, 2016.

HAY, I. D.; REHMAN, Z. U.; GHAFOR, A.; REHM, B. H. A. Bacterial biosynthesis of alginates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 85, n. 6, p. 752–759, 2010.

HOWARTH, R. W.; MARINO, R.; LANE, J.; COLE, J. J. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 1. Rates and importance. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 33, n. 4, p. 669–687, 1988.

HUANG, K.; ZHANG, X. X.; SHI, P.; WU, B.; REN, H. A comprehensive insight into bacterial virulence in drinking water using 454 pyrosequencing and Illumina high-throughput sequencing. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 109, p. 15–21, 2014.

JOHNSTON, A. W. B.; LI, Y.; OGILVIE, L. Metagenomic marine nitrogen fixation - Feast or famine? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, n. 9, p. 416–420, 2005.

KALBASI-ASHTARI, A.; MUKHTAR, S.; HAWKINS, S. E.; AUVERMANN, B. W. Carcass composting for management of farm mortalities: a review. **Compost Science & Utilization**, Emmaus, v. 13, n. 3, p. 180–193, 2005.

LEVY-BOOTH, D. J.; PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 75, p. 11–25, 2014.

LOCEY, K. J.; LENNON, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 113, n. 21, p. 5970-5975, 2016.

LOSS, A.; PEREIRA, M. G.; FERREIRA, E. P.; SANTOS, L. L. dos; BEUTLER, S. J.; FERRAZ JÚNIOR, A. S. de L. Frações oxidáveis do carbono orgânico em argissolo vermelho-amarelo sob sistema de aleias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 867–874, 2009.

MACEDO, C. F.; SIPAÚBA-TAVARARES, L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 149–163, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 695-703.

MADSEN, E. L. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 22, n. 3, p. 456–464, 2011.

MARQUELLI, W. A.; SILVA, W. L. de C.; DA SILVA, H. R. **Manejo da irrigação em hortaliças**. Brasília: Embrapa - SPI, 1996.

MARTINS, L. F.; ANTUNES, L. P.; PASCON, R. C.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; DIGIAMPIETRI, L. A.; BARBOSA, D.; PEIXOTO, B. M.; VALLIM, M. A.; VIANANIERO, C.; OSTROSKI, E. H.; TELLES, G. P.; DIAS, Z.; DA CRUZ, J. B.; JULIANO, L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DA SILVA, A. M.; SETUBAL, J. C. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the são paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e61928, 2013.

MEDINA, J.; MONREAL, C.; BAREA, J. M.; ARRIAGADA, C.; BORIE, F.; CORNEJO, P. Crop residue stabilization and application to agricultural and degraded soils: A review. **Waste Management**, Elmsford, v. 42, p. 41–54, 2015.

MENDES, L. W.; KURAMAE, E. E.; NAVARRETE, A. a; VAN VEEN, J. a; TSAI, S. M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME journal**, p. 1577–1587, 2014.

MENEGHINE, A. K.; SILVA, D. B.; MILLAN, R. N.; SIPAUBA-TAVARES, L. H.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, L. M. C. Bacterial community in two subtropical fishponds in São Paulo, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 7, p. 404–413, 2015.

MNIF, I.; GHRIBI, D. High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. **World journal of microbiology & biotechnology**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 691–706, 2015.

MOREIRA, L. M.; BECKER, J. D.; PÜHLER, A.; BECKER, A. The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. **Microbiology (Reading)**, Inglaterra, v. 146, n. 9, p. 2237–48, 2000.

MORETTO, C.; CASTELLANE, T. C. L.; LOPES, E. M.; OMORI, W. P.; SACCO, L. P.; LEMOS, E. G. de M. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. **International journal of biological macromolecules**, Guildford, v. 81, p. 291–8, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Fundamentos da Bioquímica. In: _____ **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 1-39.

NEWTON, R. J.; BOOTSMA, M. J.; MORRISON, H. G.; SOGIN, M. L.; MCLELLAN, S. L. A Microbial signature approach to identify fecal pollution in the waters off an urbanized coast of lake Michigan. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, n. 4, p. 1011–1023, 2013.

NEWTON, R. J.; MCLELLAN, S. L. A unique assemblage of cosmopolitan freshwater bacteria and higher community diversity differentiate an urbanized estuary from oligotrophic Lake Michigan. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. SEP, p. 1–13, 2015.

NIELSEN, S.; MINCHIN, T.; KIMBER, S.; VAN ZWIETEN, L.; GILBERT, J.; MUNROE, P.; JOSEPH, S.; THOMAS, T. Comparative analysis of the microbial communities in agricultural soil amended with enhanced biochars or traditional fertilisers. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 191, p. 73–82, 2014.

PARIKH, S. J. Soil: the foundation of agriculture. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, p. 2, 2012.

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; SA, T. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. **Journal of microbiology and biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 773–7, 2008.

RAMOS, M. R.; FAVARETTO, N.; UHLMANN, A.; DIECKOW, J.; VEZZAN, F.; ALMEIDA, L. Vegetable production under the organic system: effects on soil physical attributes. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Belém, v. 58, p. 45–51, 2015.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. In: VELÁZQUEZ, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. (Ed.). **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 15–21.

ROTHBERG, J. M.; HINZ, W.; REARICK, T. M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J. H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M. J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J. F.; MARRAN, D.; MYERS, J. W.; DAVIDSON, J. F.;

BRANTING, A.; NOBILE, J. R.; PUC, B. P.; LIGHT, D.; CLARK, T. A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J. T.; STONER, I. B.; CAWLEY, S. E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOVA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARY, M.; DIMALANTA, E.; DRESSMAN, D.; KASINSKAS, R.; SOKOLSKY, T.; FIDANZA, J. A.; NAMSARAEV, E.; MCKERNAN, K. J.; WILLIAMS, A.; ROTH, G. T.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, p. 348-352, 2011.

RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Biosynthesis of the cofactor of nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 62, p. 93–111, 2008.

SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SACCO, L. P.; CASTELLANE, T. C. L.; LOPES, E. M.; DE MACEDO LEMOS, E. G.; ALVES, L. M. C. Properties of polyhydroxyalkanoate granules and bioemulsifiers from *Pseudomonas sp.* and *Burkholderia sp.* isolates growing on glucose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 178, n. 5, p. 990-1001, 2015.

SARMENTO, H.; UNREIN, F.; ISUMBISHO, M.; STENUITE, S.; GASOL, J. M.; DESCY, J.-P. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic lake Kivu, eastern africa. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 53, n. 4, p. 756–771, 2008.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 4, p. 436–450, 2010.

SCOTTI, R.; PANE, C.; SPACCINI, R.; PALESE, A. M.; PICCOLO, A.; CELANO, G.; ZACCARDELLI, M. On-farm compost: a useful tool to improve soil quality under intensive farming systems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 107, p. 13–23, 2016.

SETTI, A. A.; LIMA, J. E. F. W.; CHAVES, A. G. M.; PEREIRA, I. C. **Introdução ao gerenciamento de recursos hídricos**. Brasília: Agência Nacional de Energia Elétrica, Superintendência de Estudos e Informações Hidrológicas, 2001. Disponível em: <hidroweb.ana.gov.br/cd2/livro.doc>. Acesso em: 11 nov. 2016.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial cell factories**, v. 5, p. 7, 2006.

SOUZA, J. L.; FAVARATO, L. F. Desenvolvimento de hortaliças e atributos do solo com adubação verde e compostos orgânicos sob níveis de N. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 19–26, 2015.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 38, n. 4, p. 319–328, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 9, p. 663–674, 2001.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 73–94, 2009.

TANG, X.; GAO, G.; QIN, B.; ZHU, L.; CHAO, J.; WANG, J.; YANG, G. Characterization of bacterial communities associated with organic aggregates in a large, shallow, eutrophic freshwater Lake (Lake Taihu, China). **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n. 2, p. 307–322, 2009.

TAVARES, L. H. S.; SANTEIRO, R. M. Fish farm and water quality management. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 35, n. 1, p. 21–27, 2013

THOMAS, T.; RUSCH, D.; DEMAERE, M. Z.; YUNG, P. Y.; LEWIS, M.; HALPERN, A.; HEIDELBERG, K. B.; EGAN, S.; STEINBERG, P. D.; KJELLEBERG, S. Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. **The ISME Journal**, v. 4, n. 12, p. 1557–1567, 2010.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Artmed: Porto Alegre, 2012.

TRIPURA, C.; SASHIDHAR, B.; PODILE, A. R. Ethyl methanesulfonate mutagenesis-enhanced mineral phosphate solubilization by groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5. **Current microbiology**, New York, v. 54, n. 2, p. 79–84, 2007.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. The ecology of UHE Carlos Botelho (Lobo-Broa Reservoir) and its watershed, São Paulo, Brazil. **Freshwater Reviews**, Ambleside, v. 6, n. 2, p. 75–91, 2013.

VALARINI, P. J.; OLIVEIRA, F. R.; SCHILICKMANN, S. de F.; POPPI, R. J. Qualidade do solo em sistemas de produção de hortaliças orgânico e convencional. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 485–491, 2011.

VALENZUELA, L.; CHI, A.; BEARD, S.; ORELL, A.; GUILIANI, N.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; JEREZ, C. A. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2006.

VAL-MORAES, S. P.; MARCONDES, J.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 1997–2003, 2011.

VAN KRANENBURG, R.; BOELS, I. C.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 10, n. 5, p. 498–504, 1999.

VARY, P. S.; BIEDENDIECK, R.; FUERCH, T.; MEINHARDT, F.; ROHDE, M.; DECKWER, W.-D.; JAHN, D. *Bacillus megaterium*---from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, n. 5, p. 957–967, 2007.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M. Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, n. 6, p. 599–602, 1995.

WEI, Y.; ZHAO, Y.; XI, B.; WEI, Z.; LI, X.; CAO, Z. Changes in phosphorus fractions during organic wastes composting from different sources. **Bioresource technology**, Essex, v. 189, p. 349–56, 2015.

YE, J.; ZHANG, R.; NIELSEN, S.; JOSEPH, S. D.; HUANG, D.; THOMAS, T. A Combination of biochar-mineral complexes and compost improves soil bacterial processes, soil quality, and plant properties. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 372, 2016.

ZHANG, Y. L.; DAI, J. L.; WANG, R. Q.; ZHANG, J. Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 44, n. 1, p. 84–91, 2008.

ZOZAYA-VALDÉS, E.; ROTH-SCHULZE, A. J.; THOMAS, T. Effects of temperature stress and aquarium conditions on the red macroalga *Delisea pulchra* and its associated microbial community. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 161, 2016.

CAPÍTULO 2 – Análise metagenômica de solo da horta e água usada para irrigação de uma área agrícola sob efeito de composto orgânico

Aylan Kener Meneghini¹, Shaun Nielsen², Alessandro de Mello Varani¹, Torsten Thomas², Lucia Maria Carareto Alves^{1*}

¹Departamento de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, Univ. Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

² School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Centre for Marine Bio-Innovation, University of New South Wales, NSW 2052, Australia

Resumo

Comunidades microbianas possuem um papel importante nos ciclos biogeoquímicos, uma vez que participam na decomposição de resíduos e reciclagem de nutrientes essenciais para todos os organismos. Em áreas agrícolas, os micro-organismos tem uma importante função auxiliando em vários processos biológicos, como é o exemplo dos ciclos biogeoquímicos. Além disso, a utilização de composto orgânico em áreas agrícolas, também auxilia na melhora da qualidade do solo, fazendo com que haja um aumento da carga de nutrientes essenciais no ambiente aumentando assim a produtividade. Neste estudo, através de uma abordagem metagenômica, investigou-se a taxonomia e perfil funcional entre amostras de solo de uma horta e da água doce utilizada para irrigação localizados na mesma área agrícola da fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Escolheu-se este local, porque no solo da horta vem sendo utilizado um composto orgânico atípico feito a partir de vários resíduos vegetais e animais, incluindo carcaça animal. A análise taxonômica revelou dominância de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* nas amostras de solo e *Polynucleobacter* nas amostras de água. A análise estatística da comparação da abundância relativa dos táxons analisados entre as amostras de solo e água mostrou significância (p-valor < 0,05), demonstrando proporções taxonômicas específicas dos grupos em cada amostra analisada. Com relação à análise funcional do metabolismo de nitrogênio, enxofre e fósforo detectaram-se vias metabólicas incompletas, entretanto observou-se grandes valores de abundância relativa de genes pertencentes a cada um dos ciclos

biogeoquímicos, como *norB*, *cysD* e *appA*. A partir de uma análise exploratória dos dados utilizando agrupamento hierárquico da composição do perfil funcional baseado no *Kegg Orthology*, sugeriu-se que a água utilizada para irrigação exerce maior influência no solo do que o composto orgânico utilizado. De acordo com os resultados apresentados neste primeiro estudo na área, tanto o solo da horta quanto a água utilizada para irrigação mostraram diversidade bacteriana comumente encontrada em várias outras áreas agrícolas. Ressaltando que, aparentemente a água usada no processo de irrigação do solo possui maior influência nos aspectos funcionais do mesmo.

Keywords: Ciclos biogeoquímicos, diversidade bacteriana, *norB*.

Introdução

Comunidades microbianas são diversas e complexas, desempenhando um importante papel na decomposição de resíduos e ciclagem de nutrientes. O conhecimento dos ciclos biogeoquímicos e dos micro-organismos que participam dos ciclos, são importantes na compreensão ecológica da reciclagem de nutrientes nos ambientes e também de como eles mantêm a biosfera (MADSEN, 2011). E com isso, através de técnicas de metagenômica é possível acessar grande parte da informação necessária para se conhecer quais os genes e organismos habitam o ecossistema em estudo e assim desvendar como os processos biogeoquímicos ocorrem no local.

Nos dias atuais, abordagens metagenômicas tem sido utilizada para descrever e entender a diversidade taxonômica e funcional de vários ambientes, como sedimento, composto orgânico, solos de agricultura e água de rios, oceanos entre outros (ANDREOTE et al., 2012; MARTINS et al., 2013; MENDES et al., 2014). Essas técnicas tornaram-se importantes em ecologia microbiana na compreensão de como os micro-organismos interagem e também para investigar possíveis alterações ambientais causadas, por exemplo, através de influências antropogênicas (NEWTON; MCLELLAN, 2015; CHÁVEZ-ROMERO et al., 2016).

Em áreas agrícolas, há uma intensa atividade antropogênica juntamente com mudanças climáticas. Com isso, ocorre uma busca para melhorar a qualidade e produtividade do solo, sendo estes exemplos apenas dois entre tantos (SCOTTI et al., 2016; YE et al., 2016). A aplicação de diferentes tipos de

composto orgânico, tem se mostrado um sucesso em vários casos na melhora da qualidade do solo. Através de alguns estudos, foi possível entender como o composto orgânico é um processo eficiente, econômico e importante para estabilização e reciclagem de resíduos de biomassa na agricultura (MARTINS et al., 2013; MEDINA et al., 2015; SCOTTI et al., 2016). Para compostagem, muitos resíduos de biomassa podem ser utilizados, como vegetais, esterco animal, lodo de esgoto tratado (ZHANG et al., 2008; WEI et al., 2015; HAMM et al., 2016). Entretanto, até hoje, há poucos estudos relatando a composição microbiana em áreas fertilizadas com composto orgânico feito a partir de resíduos vegetais e animais, incluindo aqueles que utilizam carcaça animal. De modo geral, o processo de compostagem utilizando carcaças permite a decomposição por meio de micro-organismos termofílicos que aquecem a pilha, o que mata a maioria dos micro-organismos patogênicos e digere o tecidos das carcaças sob condições predominantemente aeróbias (KALBASI-ASHTARI et al., 2005).

É importante também observar a qualidade da água utilizada para fins de irrigação, uma vez que se a mesma estiver poluída ou com alta concentração de nutrientes pode haver um efeito negativo no ambiente além de prejudicar o alimento produzido na área (DAHAN et al., 2014). A partir dessas observações, fica claro que o conjunto de variáveis como aplicação de composto orgânico ou fertilização mineral, e a água utilizada para irrigar culturas são importantes fatores para manter a qualidade e produtividade do solo. Além disso, é evidente que a agricultura sustenta e define nosso estilo vida, mas muitas vezes causa danos a ambientes naturais (PARIKH, 2012).

Embora existam muitos estudos referente as diferenças sobre a comunidade microbiana, aspectos funcionais e qualidade do solo sob diferentes tipos de composto orgânico sendo desenvolvidos (SUL et al., 2013; NIELSEN et al., 2014; HAMM et al., 2016; YE et al., 2016). Há uma escassez de estudos sobre a mesma informação com relação a água proveniente de rios, córregos, lagos, entre outros. De acordo com nosso conhecimento, há também poucos estudos sobre os aspectos taxonômicos e funcionais relativos a ambientes sob fertilização orgânica com adubo orgânico feito a partir de resíduos vegetais, esterco e carcaça animal em áreas agrícolas.

Neste trabalho, investigou-se o microbioma e o perfil funcional do solo de uma horta e água utilizada para sua irrigação, localizada na mesma área agrícola, localizada na fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Partiu-se do princípio de que o solo da horta, estava tendo seu microbioma influenciado devido à fertilização com adubo orgânico e também irrigação com a água oriunda do córrego que corta a fazenda. Este é o primeiro estudo na área, e o que guiou o interesse em explorá-la foi a informação de como a fertilização vem sendo aplicada nos últimos 10 anos: a área de estudo vem sendo fertilizada com um composto orgânico feito com resíduos vegetais e animais (esterco e carcaça). Neste contexto, realizaram-se análises da diferença na abundância relativa referente à taxonomia e perfil funcional desta área ainda inexplorada.

Material e métodos

Caracterização da área de estudo e amostragem

O estudo foi realizado na fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), localizado em Araçoiaba da Serra – São Paulo. Desde 2005, a fazenda aplica um composto orgânico no solo feito com vários resíduos vegetais e animais, incluindo carcaça de pequenos e grandes animais do próprio zoológico (MARTINS et al., 2013). O composto orgânico é aplicado a uma taxa de 200 t ha⁻¹ após o preparo do solo na área agrícola que produz vegetais para alimentar os animais do FPZSP. Além disso, fertilizantes minerais (superfosfato, potássio, borax e sulfato de amônio) também são aplicados no solo da horta, com a proposta de fornecer nutrientes específicos para o solo dependendo da cultura a ser plantada.

A irrigação do solo ocorre utilizando-se a água do córrego que corta a fazenda que é denominado Ribeirão do Lajeado e está localizado a 30 m da área da horta. O córrego possui uma elevação média de 637m e pertence à bacia do rio Sorocaba e Médio Tiête. Esse córrego está sob influência de atividades agrícolas realizadas na fazenda do zoológico, e também de outras propriedades rurais ao redor do córrego.

A amostragem foi realizada em setembro de 2014, um período com temperatura média de 22°C e precipitação de 12 mm (<http://www.inmet.gov.br/portal/>). Neste período, a estação foi caracterizada como seca, mas dois dias antes da coleta de amostras, ocorreu uma leve chuva na região, e três dias antes da coleta houve aplicação de fertilizantes minerais no solo da horta.

O solo da horta (SVG – *Soil from Vegetable Garden*) (23°34'47,17"S; 47°35'12,02"O) e a água utilizada para irrigação (FW - *Freshwater*) (23°34'46,07"S; 47°35'17,46"O) localizados na mesma área agrícola foram a base para o desenvolvimento deste estudo. Três réplicas biológicas de solo (0 – 20 cm de profundidade), sem raízes, foram coletadas aleatoriamente na horta. Da mesma maneira, três réplicas biológicas de água (0 – 30 cm) também foram coletadas em um ponto adjacente a uma moto bomba que capta água do córrego para irrigação. Este ponto de coleta de água está localizado abaixo da localização da horta. As seis amostras coletadas foram usadas para analisar a taxonomia microbiana, diversidade funcional, e também as propriedades físicas e químicas do solo e da água. Vale ressaltar que cada amostra foi analisada separadamente.

Análises física e química das amostras de solo e água

As amostras de solo foram secas à temperatura ambiente e gentilmente desagregadas. Após isso, realizou-se análises de matéria orgânica, composição elementar (Ca, Cu, Mg, Mn, P, K, Fe, Zn) e pH de acordo com método descrito por Van Raij et al. 2001.

Para as amostras de água, medições de condutividade elétrica (CE), oxigênio dissolvido (OD), pH, potencial de oxidação-redução (ORP), sólidos totais dissolvidos (STD) e turbidez foram determinados no local, com uma sonda multiparâmetros Horiba U-50. Os parâmetros químicos como nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺, método fenato); nitrato (N-NO₃⁻, método de redução), nitrito (N-NO₂⁻, método colorimétrico utilizando dicloridrato NED), fósforo total (PT, método de digestão com ácido sulfúrico e nítrico) e fósforo reativo dissolvido (PRD, método ácido ascórbico) foram determinados através de espectroscopia

molecular; cloreto (Cl⁻) foi determinado por titrimetria de precipitação (método argentométrico). Todos esses métodos foram conduzidos de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Extração de DNA e sequenciamento

O DNA total da microbiota da água foi extraído utilizando o kit *PowerWater® DNA Isolation kit* (Mo Bio Inc. Carlsbad CA, USA) de acordo com protocolo do fabricante. Para a extração, aproximadamente 300 mL de água foi filtrada em membrana de 0,22 µm, e este material usado então no processo de extração de DNA. Já o DNA total da microbiota do solo foi extraído utilizando-se o *PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation kit* (Mo Bio Inc. Carlsbad CA, USA), também de acordo com protocolo do fabricante. No processo de extração de DNA foi utilizado 50 mg de solo previamente pesados em balança analítica.

A qualidade do DNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose e 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), e os DNAs foram quantificados por fluorescência (Qubit). O DNA total da microbiota de cada replica ambiental foi sequenciado pela metodologia WGS (*Whole Genome Shotgun*) através de tecnologia Ion Proton com chip PI e Ion PI *Template OT2* 200 v3 (Life Technologies) e Ion PI *sequencing* 200 v3 (Life Technologies) de acordo com protocolo do fabricante.

Processamento das sequencias de DNA

Os *reads* das sequencias brutas obtidas através do sequenciamento do DNA total foram filtradas por qualidade e tratadas utilizando o software Prinseq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). As sequencias foram tratadas com qualidade média (Q) igual ou superior a 20, e então verificadas através do software FastQC (ANDREWS, 2010). Os conjuntos de resultados das sequencias com boa qualidade foram submetidas para anotação no MG-RAST *metagenomics analysis server version 3.6* (MEYER et al., 2008).

Para as análises da composição microbiana e perfil funcional relacionado aos genes dos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio, enxofre e fósforo, utilizou-se

as sequências geradas neste estudo (SVG e FW). Além disso, selecionou-se as sequências do composto orgânico, geradas pelo trabalho de MARTINS et al. (2013), que estão disponíveis publicamente no MG-RAST. Portanto, com o intuito de comparação entre as amostras SVG e FW, analisou-se também a amostra do composto orgânico referente à ZC2, pois ela corresponde à etapa final do processo de compostagem e é a mais próxima da que foi aplicada no solo (MARTINS et al., 2013).

Análise da composição microbiana foi realizada usando a ferramenta *Best hit classification* do MG-RAST. Os dados foram comparados com o banco de dados SSU-SILVA (não-redundante) (QUAST et al., 2013) com *e-value* máximo de $1e-5$, mínima identidade de 80%, e comprimento mínimo de alinhamento de 60 pb, o que gerou uma tabela com grupos taxonômicos. A classificação funcional foi realizada utilizando-se a ferramenta *Hierarchical classification*, também do MG-RAST, baseado no *Kegg Orthology* (KO) (KANEHISA, 2000). Os dados foram comparados seguindo os parâmetros: *e-value* máximo $1e-5$, mínima identidade de 80% e comprimento mínimo de alinhamento de 20 aminoácidos para identificação de proteínas.

Para identificação da afiliação de genes funcionais relacionados com metabolismo do nitrogênio, enxofre e fósforo (inositol-fosfato), os genes selecionados foram estocados no *workbench* do MG-RAST e então submetidos para análise utilizando a ferramenta *Best hit classification* usando a base de dados de proteínas KEGG, com os parâmetros descritos anteriormente para identificação do perfil funcional.

Análises estatísticas das comunidades microbianas e perfil funcional

As análises estatísticas das comunidades microbianas, agrupamento hierárquico, comparação da abundância relativa e classificação funcional foram realizadas utilizando-se pacotes de dados específicos do software livre R (<https://cran.r-project.org/>). Devido à grande diferença no número da contagem de sequências por amostra, os dados foram normalizados por subamostragem usando Mothur (versão 1.36.0) (SCHLOSS et al., 2009). A abundância diferencial dos grupos taxonômicos entre os ambientes foi realizada usando o

pacote *mvabund* (WANG et al., 2012). Para testar se houve diferença na significância estatística entre as amostras de solo e água, os dados foram ajustados para MGLM (Resposta Multivariada de Modelos Lineares Gerais). Para testar a hipótese multivariada, utilizou-se a função ANOVA (que implementa uma análise de variância), aplicada ao MGLM usando reamostragem de Monte Carlo e valores ajustados de p-valor, retornando assim as diferenças entre as comunidades dos grupos analisados. Adicionalmente, esses testes de ANOVA univariados foram ordenados por abundância relativa para se identificar o táxon que mais contribuiu na diferença bacteriana entre as amostras de solo e água.

De modo a analisar os genes mais abundantes relacionados com o metabolismo de nitrogênio, enxofre e fósforo (inositol-fosfato), os dados brutos de abundância do MG-RAST foram ajustados para abundância relativa de modo a normalizar os dados devido à grande diferença no número de sequências por amostra observada. Feito isso, os dados foram agrupados usando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis e um heatmap foi criado para cada metabolismo com o intuito de comparação dos genes entre as amostras. Para essa análise foi considerado a média da abundância relativa das três réplicas das amostras pertencentes a SVG e FW.

Para verificar a estrutura taxonômica dos genes funcionais relacionados ao metabolismo de nitrogênio, enxofre e fósforo, uma matriz de presença e ausência foi criada para as amostras SVG, FW e ZC, de acordo com protocolo do pacote *vegan* v.2.2-1 através da função *decostand* (OKSANEN et al., 2013). Foi considerada presença apenas os gêneros com $n = 3$ para SVG e FW. Após isso, um diagrama de Venn foi construído para comparar a afiliação taxonômica compartilhada entre as amostras SVG, FW e ZC.

Adicionalmente, uma análise exploratória de dados foi realizada através do escalonamento multidimensional não métrico (nMDS). Utilizou-se uma matriz dos dados funcionais dos metagenomas das amostras deste estudo (SVG e FW) e nove outros metagenomas públicos contidos no MG-RAST (Tabela 2). Para essa análise, utilizou-se o nível de genes funcionais do KO e índice de dissimilaridade Bray-Curtis. Os dados funcionais foram normalizados por abundância relativa. Para todas essas análises funcionais, os níveis relacionados a sistemas de organismos e processamento de informação

genética foram excluídos das análises. Isso porque em processamento de informação genética há informações que todas as bactérias possuem em comum. E em sistemas de organismos há informações de genes relacionados a sistema circulatório, sistema digestivo, envelhecimento, etc; e esses itens não fazem parte do objetivo do trabalho.

Tabela 2. Descrição dos metagenomas públicos utilizados na análise exploratória de dados a fins de comparação funcional com as amostras de solo de horta (SVG) e água usada para irrigação (FW).

| MG-RAST | Projeto | Bioma | Material | Legenda | Local |
|-----------|---|---|--------------------|-------------------------|--|
| 4479361.3 | Sao Paulo Zoo Composting | <i>Subtropical and temperate rainforests or woodlands</i> | composto | ZC1 | Brasil (FPZSP) |
| 4479944.3 | Sao Paulo Zoo Composting | <i>Subtropical and temperate rainforests or woodlands</i> | composto | ZC2 | Brasil (FPZSP) |
| 4482593.3 | <i>Enriched soil metagenomes for Glycoside Hydrolases</i> | <i>Tundra biome</i> | solo | Solo de tundra | Canadá (Daring Lake, NWT) |
| 4482600.3 | <i>Enriched soil metagenomes for Glycoside Hydrolases</i> | <i>Terrestrial biome</i> | solo | Solo de agricultura | Canadá (Elora research station, Guelph, ON) |
| 4493548.3 | <i>Amazon Soil Metagenome 1</i> | <i>Terrestrial biome</i> | solo | Solo amazônia | Brasil (Amazônia) |
| 4502539.3 | ISA-SMC-2011 | <i>Prairie Division (250)</i> | solo arável | Solo de pradaria arável | EUA (Auburn, IL) |
| 4510943.3 | M3P 2012 | <i>Large river biome</i> | água de superfície | Rio em Minnesota | EUA (Minnesota) |
| 4533731.3 | <i>Columbia River coastal margin study</i> | <i>Estuarine biome</i> | água doce | Estuário | EUA (Columbia River coastal margin, OR & WA) |
| 4628879.3 | <i>Fate and Transport of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes During Historic Colorado Flood</i> | <i>Large river biome</i> | água | Água de enchente | EUA (Poudre River near Fort Collins, CO) |

Os conjuntos de dados do MG-RAST deste estudo podem ser acessados publicamente através dos números de acesso: 4622702.3 (SVG1), 4622703.3 (SVG2), 4622704.3 (SVG3), 4622705.3 (FW1), 4622706.3 (FW2), 4622707.3 (FW3).

Resultados

Análises física e química das amostras de solo e água

As análises do solo revelaram que o mesmo é ácido ($\text{pH} = 5,57 \pm 0,09$), com alta concentração de fósforo ($486,67 \pm 45,39 \text{ mg/dm}^3$), cálcio ($82,67 \pm 7,86 \text{ mmol/dm}^3$) e ferro ($59 \pm 3,00 \text{ mmol/dm}^3$) (Tabela 3). Entretanto, as análises da água mostraram baixas concentrações das formas de nitrogênio avaliadas (NH_4^+ , NO_3^- e $\text{NO}_2^- \leq 1,02 \text{ mg L}^{-1}$) e também de fósforo (PRD e PT $\leq 0,16 \text{ mg L}^{-1}$). Além disso, foram observados baixos níveis de demanda química de oxigênio ($4,33 \pm 0,33 \text{ mg L}^{-1}$), sólidos totais dissolvidos ($27,67 \pm 3,18 \text{ g L}^{-1}$) e turbidez ($136,67 \pm 7,31 \text{ UNT}$). E o pH da água foi caracterizado como neutro, de acordo com o valor encontrado ($6,92 \pm 0,01$) (Tabela 4). Em síntese, esses resultados mostraram que a água possui uma baixa concentração de nutrientes, enquanto o solo há uma grande concentração de macro nutriente.

Tabela 3. Média \pm erro padrão (n =3) das propriedades químicas do solo da horta (SVG).

| Variável | Concentração |
|--------------------------------------|--------------------|
| pH (CaCl_2) | $5,57 \pm 0,09$ |
| Matéria Orgânica (g/dm^3) | $40,33 \pm 0,88$ |
| P (mg/dm^3) | $486,67 \pm 45,39$ |
| K (mmol/dm^3) | $4,57 \pm 0,07$ |
| Ca (mmol/dm^3) | $82,67 \pm 7,86$ |
| Mg (mmol/dm^3) | $19,67 \pm 1,20$ |
| B (mmol/dm^3) | $0,45 \pm 0,02$ |
| Cu (mmol/dm^3) | $0,43 \pm 0,03$ |
| Fe (mmol/dm^3) | $59 \pm 3,00$ |
| Mn (mmol/dm^3) | $1,70 \pm 0,12$ |
| Zn (mmol/dm^3) | $7,23 \pm 0,23$ |

Tabela 4. Média \pm erro padrão (n =3) propriedades químicas e físicas da água utilizada para irrigação (FW).

| Variável | Concentração |
|--|--------------------|
| NO ₂ (mg L ⁻¹) | 0,06 \pm 0,00 |
| NO ₃ (mg L ⁻¹) | 1,02 \pm 0,01 |
| NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹) | 0,04 \pm 0,00 |
| PT (mg L ⁻¹) | 0,16 \pm 0,00 |
| PRD (mg L ⁻¹) | 0,02 \pm 0,00 |
| DQO (mg L ⁻¹) | 4,33 \pm 0,33 |
| Temperatura (°C) | 22,26 \pm 0,77 |
| pH | 6,92 \pm 0,01 |
| Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹) | 7,37 \pm 0,66 |
| CE (μ S cm ⁻¹) | 41,67 \pm 5,61 |
| Turbidez (NTU) | 136,67 \pm 7,31 |
| ORP (mV) | 212,00 \pm 27,51 |
| STD (g L ⁻¹) | 27,67 \pm 3,18 |

PT: Fósforo total; PRD: Fósforo reativo dissolvido; DQO: Demanda Química de Oxigênio; CE: condutividade elétrica; ORP: Potencial de óxido-redução; STD: Sólidos totais dissolvidos.

Processamento, qualidade e anotação das sequencias

DNA metagenômico com alto peso molecular foi extraído de cada amostra ambiental e então submetido ao sequenciamento utilizando tecnologia Ion Proton (Life Technologies). Cada amostra rendeu acima de $2,316 \times 10^7$ reads (Tabela 5). Entretanto após o tratamento de qualidade dos reads, o número mínimo obtido de sequencias por amostra foi $1,943 \times 10^7$. Como também pode ser observado pela tabela 5, o conteúdo de GC foi maior nas amostras de solo do que nas amostras de água. Além disso, o tamanho médio dos reads foi um pouco abaixo do esperado, uma vez que se preparou as amostras para sequenciamento estipulando um comprimento de reads de 200 pb por amostra, de acordo com o protocolo do fabricante. E neste trabalho obteve-se um comprimento de 93 pb para SVG e aproximadamente 110 pb para FW (Tabela 5).

Tabela 5. Métrica das sequências de DNA metagenômico das amostras de solo da horta (SVG) e água usada para irrigação (FW). Na tabela são mostrados os valores de cada réplica sequenciada com base no sistema de anotação MG-RAST.

| Amostras | Número de sequências | Número de sequências após controle de qualidade | Conteúdo médio de GC | Tamanho médio dos <i>reads</i> |
|----------|----------------------|---|----------------------|--------------------------------|
| SVG1 | 31,764,931 | 28,588,669 | 63 ± 8 % | 93 bp |
| SVG2 | 44,539,294 | 42,109,184 | 63 ± 8 % | 93 bp |
| SVG3 | 23,164,262 | 19,428,522 | 62 ± 9 % | 93 bp |
| FW1 | 32,542,115 | 26,668,719 | 46±12 % | 108 bp |
| FW2 | 30,563,031 | 28,289,666 | 49±11 % | 109 bp |
| FW3 | 48,438,622 | 41,940,721 | 49±12 % | 120 bp |

Comparação taxonômica entre os ambientes

A análise da estrutura taxonômica mostrou que os ambientes são dominados por bactérias (97,6 % no solo e 95,2 % na água). Além disso, houve também uma porcentagem de arqueias (1 % no solo e 0,2 % na água), grupos pertencentes ao domínio eucarioto (0,9 % no solo e 1,9 % na água) e sequências não atribuídas a nenhum domínio (0,5 % no solo e 2,7 % na água).

A composição bacteriana dos metagenomas pertencentes as amostras SVG e FW foram avaliadas através do banco de dados SSU Silva disponível no MG-RAST. Um total de 22 filos bacterianos foi observado nos ambientes, entretanto houve uma grande proporção de sequências não classificadas para o domínio bactéria (aproximadamente 40 % nas amostras de água e 20 % nas amostras de solo, Figura 1A). A comparação dos filos bacterianos entre as amostras em um p-valor < 0,05 mostrou significância estatística (Tabela S3). No que diz respeito à abundância relativa dos filos, observou-se que Proteobacteria, Cyanobacteria e Bacteroidetes assim como o número de sequências não

classificadas foram maiores para FW do que SVG (Figura 1A, Tabela S3). Enquanto que os filos Actinobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Chloroflexi, e Acidobacteria foram observados em maior abundância em SVG do que FW (Figura 1A, Tabela S1).

No que diz respeito à classe de Proteobacterias (Figura 1B), destaca-se a grande abundância de Betaproteobacteria na amostra FW. Enquanto que em SVG, observa-se maior abundância de Alphaproteobacteria.

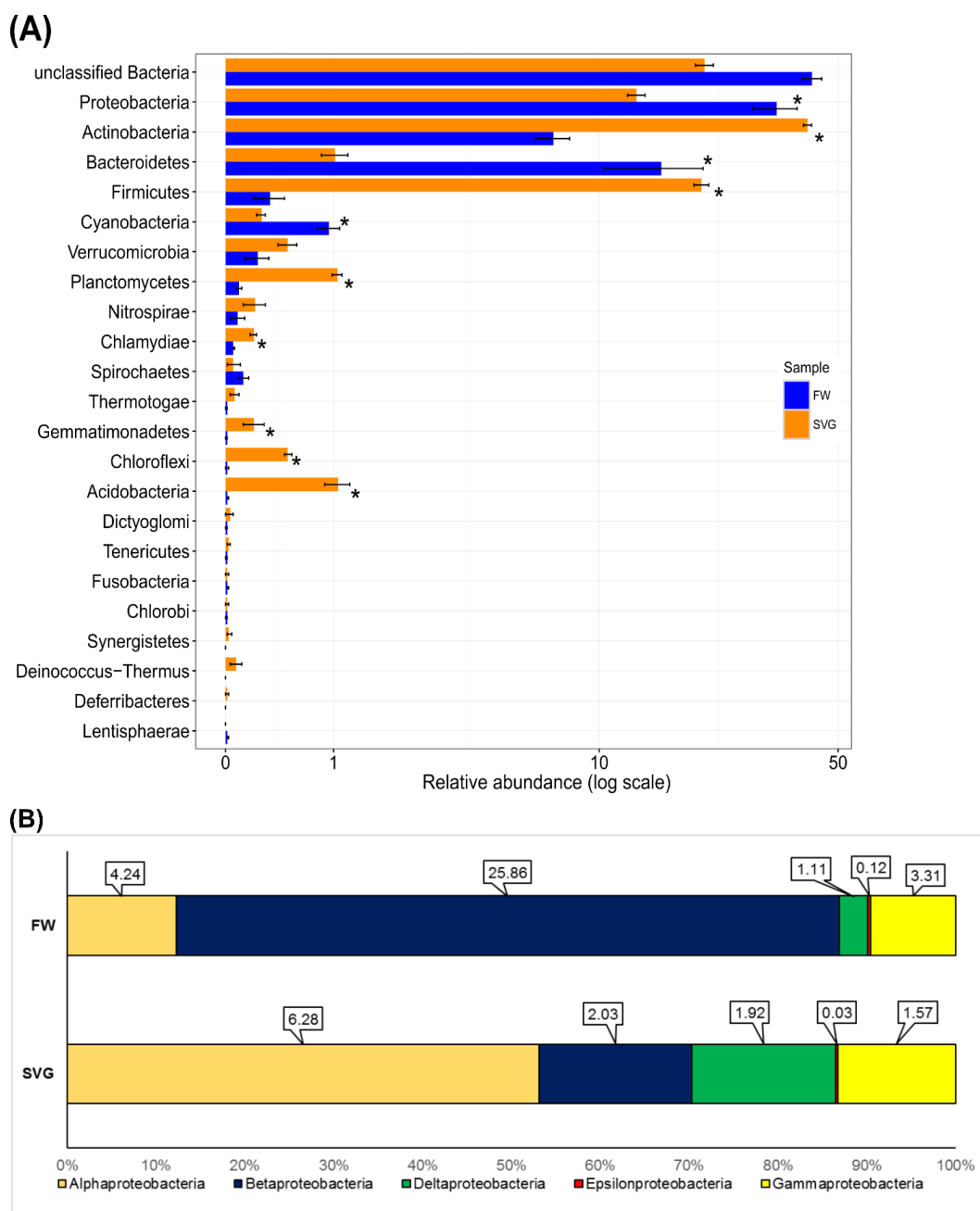


Figura 1 Abundância relativa da composição bacteriana das amostras do solo da horta (SVG) e água usada para irrigação (FW). A figura mostra (A) distribuição

taxonômica dos filos bacterianos e (B) abundância relativa da classe de Proteobacteria. Os asteriscos (*) indicam os filos que mostraram significância estatística entre os dois ambientes (p -valor < 0,05).

A nível de gênero, observou-se um total de 680 gêneros bacterianos, de acordo com o banco de dados SSU-Silva. Dos quais, apenas 65 mostraram diferença significativa com p -valor < 0,05 entre SVG e FW (Tabela S2). Dentre os gêneros mais abundantes, destacou-se *Polynucleobacter* (amostra FW, 10%) e *Bacillus* (amostra SVG, 9%).

Em uma comparação da abundância relativa e diferença significativa dos 20 gêneros bacterianos mais abundantes entre os ambientes analisados, observou-se que *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Micromonospora*, *Nocardioides*, *Conexibacter*, e *Paenibacillus* foram encontrados em maior número em SVG (Figura 2 e Tabela S2). Enquanto que os gêneros *Terrimonas*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Flectobacillus*, *Acidovorax*, *Candidatus Rhodoluna*, *Polynucleobacter* e Betaproteobacteria não classificadas foram mais abundantes em FW (Figura 2 e Tabela S2).

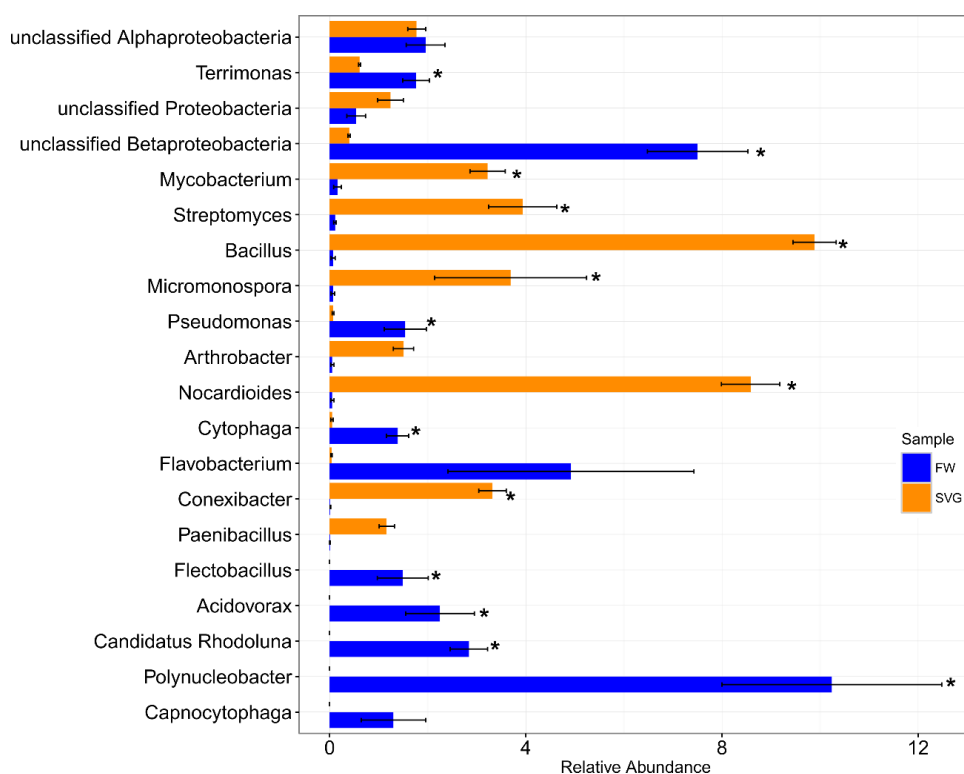


Figura 2 Abundância relativa da composição bacteriana no nível de gênero das amostras de solo da horta (SVG) e água usada para irrigação (FW). A figura

mostra a distribuição taxonômica dos 20 gêneros mais abundantes. Além disso, o asterisco (*) indica os gêneros que mostraram diferença significativa entre os ambientes (p-valor < 0,05).

Comparação do metabolismo dos ciclos biogeoquímicos entre os ambientes

O perfil funcional dos metagenomas das amostras de SVG e FW foi determinado através da classificação de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio, enxofre e fósforo baseado nos grupos de genes ortólogos do *Kegg Orthology* (KO) contido no MG-RAST (Figura 3).

No mais elevado nível hierárquico do KO, avaliou-se a distribuição dos genes relacionados com o metabolismo de nitrogênio comparando as amostras deste estudo (SVG e FW) com as do composto orgânico (ZC2) usado no solo da horta. Nenhum gene relacionado ao ciclo do nitrogênio no meio ambiente foi encontrado na amostra ZC2 com os parâmetros adotados na metodologia deste trabalho. Entretanto, a distribuição desses genes nas amostras SVG e FW mostrou-se diferente (Figura 3A). De acordo com os resultados obtidos, observa-se que em SVG há maior abundância de genes relacionados com o processo de desnitrificação, como *norB*, *napA*, *nitrite reductase (NO-forming)* e *nosZ*. Dentre eles, o gene *norB* foi o que mostrou maior abundância entre todos. Pela visualização dos resultados ilustrados a partir do *heatmap* abaixo, é possível observar também que nas amostras FW houve uma menor abundância dos mesmos genes citados acima, mas por outro lado, percebe-se uma abundância um pouco maior de genes relacionados com a fixação de nitrogênio, como *nifHDK*.

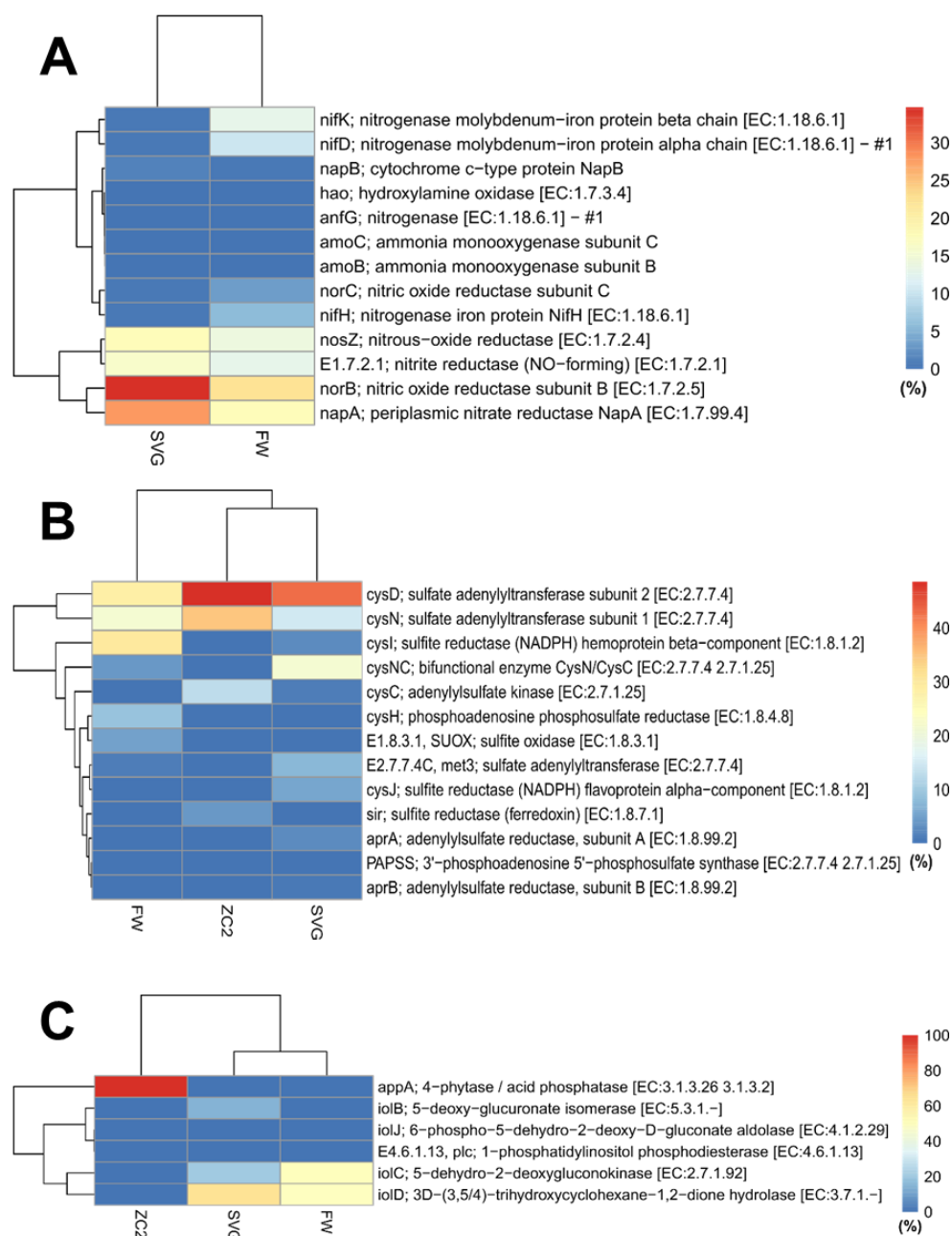


Figura 3 Distribuição dos genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio, enxofre e fósforo baseado no *Kegg Orthology* (KO) pertencentes às amostras de solo da horta (SVG), água utilizada para irrigação (FW) e composto orgânico (ZC2). A figura mostra a abundância relativa (%) média de cada gene presente nas amostras analisadas de acordo com a anotação do MG-RAST utilizando o KO como fonte de referência. No qual (A) é referente ao metabolismo de nitrogênio, (B) metabolismo de enxofre e (C) metabolismo de fósforo (inositol-fosfato).

No que diz respeito ao ciclo biogeoquímico do enxofre, estudou-se os genes relacionados à redução e oxidação do sulfato pelas vias assimilatória e dissimilatória (Figura 3B). De modo geral, as amostras FW, ZC2 e SVG demonstraram uma abundância maior de genes relacionados à redução assimilatória do sulfato, como *cysD*, *cysN*, e *cysI*. Destacando-se a grande abundância de *cysD* na amostra ZC2 e o agrupamento entre ZC2 e SVG, indicando um perfil funcional similar, em se tratando do metabolismo do enxofre nesses ambientes.

Com o intuito de analisar o ciclo do fósforo no ambiente, optou-se por avaliar o metabolismo do inositol-fosfato como via metabólica de referência. Curiosamente, através destes resultados foi possível verificar a elevada abundância do gene *appA*, que codifica a enzima 4-fitase (Figura 3C) em ZC2. Por outro lado, quando observados os resultados para as amostras SVG e FW, percebeu-se que apenas poucos genes foram identificados, e que essas amostras possuem um perfil similar com relação ao metabolismo de fósforo.

De maneira a se identificar a composição bacteriana participante dos ciclos do nitrogênio, enxofre e fósforo, os genes estudados foram selecionados, para se obter quais gêneros bacterianos são responsáveis por cada processo nas amostras SVG, FW e ZC2. Essa análise resultou na criação de três diagramas de Venn, no qual estão identificados quais são os gêneros bacterianos em comum nas amostras de acordo com cada ciclo (Figura 4). Com relação ao ciclo do nitrogênio, observaram-se apenas quatro gêneros bacterianos em comum entre as amostras SVG e FW sendo, *Acidivorax*, *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas* e *Xanthobacter* (Figura 4). Em contraste, no ciclo do enxofre, pode-se observar 18 diferentes gêneros bacterianos, nos quais se percebe a presença das mesmas quatro bactérias citadas acima, relacionadas ao ciclo do nitrogênio (Figura 4). Todos os gêneros bacterianos citados pertencem ao filo Proteobacteria, um dos mais abundantes neste estudo e que mostrou diferença significativa entre as amostras (p -valor < 0,05) neste estudo.

De uma maneira diferente, no ciclo do fósforo observou-se a presença de apenas uma bactéria em comum nas amostras analisadas, *Burkholderia* (Figura 4). Vale ressaltar que ela, também está presente no conjunto de bactérias responsáveis pelo ciclo do enxofre. Bactérias do gênero *Burkholderia* são bem

conhecidas e estudadas nos dias de hoje, sendo uma das bactérias responsáveis pela solubilização de fosfato no solo.

Uma observação importante de se notar é a ausência de gêneros bacterianos em comum entre as amostras ZC2 com SVG e/ou FW.

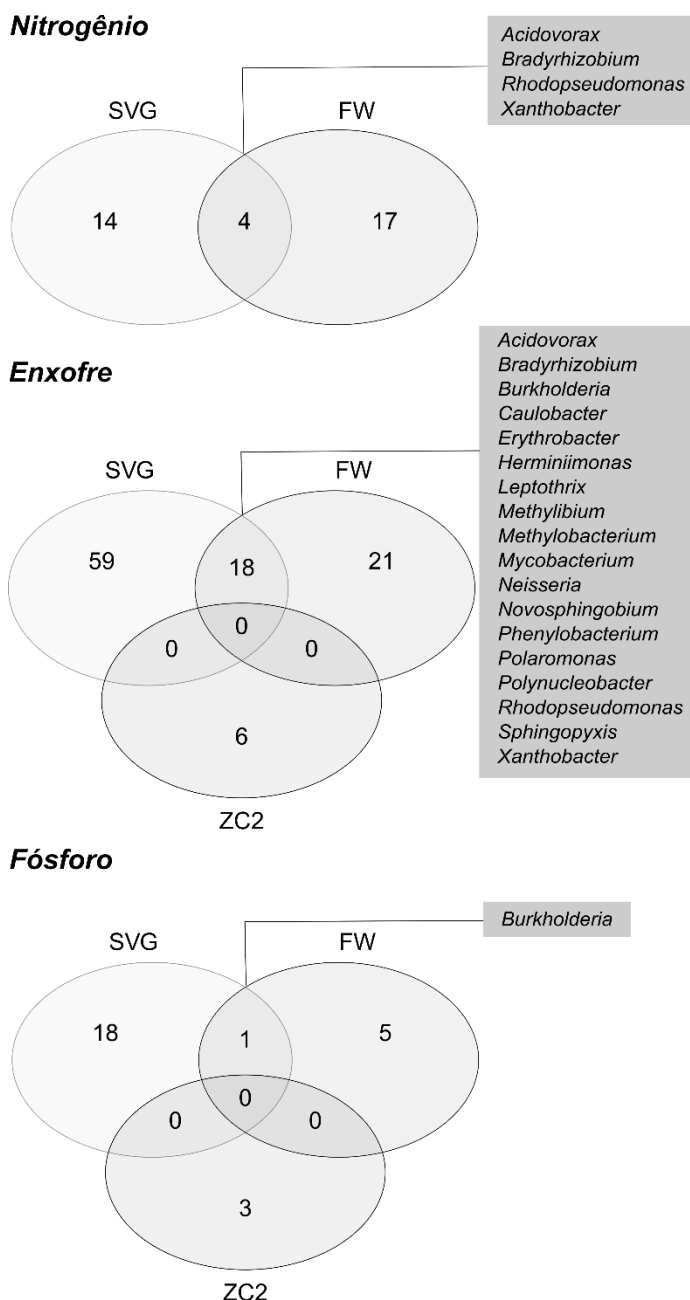


Figura 4 Principais gêneros bacterianos ligados aos ciclos biogeoquímicos das amostras estudadas: composto orgânico (ZC2), solo da horta (SVG) e água usada para irrigação (FW). A figura mostra três diagramas de Venn ilustrando os

diferentes metabolismos analisados (nitrogênio, enxofre e fósforo) e os gêneros bacterianos em comum entre as amostras.

Além disso, um nMDS do perfil de genes funcionais baseado no KO como fonte de anotação foi realizado para comparar os metagenomas deste estudo com outros 9 metagenomas públicos, encontrados no MG-RAST, incluindo aqueles relacionados ao composto orgânico utilizado como fertilizante no solo da horta (Tabela 2). Através, do gráfico (Figura 5) é possível observar uma similaridade entre as amostras SVG e FW, uma vez que elas apresentam proximidade. Outra importante observação a ser feita é a dissimilaridade das amostras SVG quando comparadas às outras amostras de solo analisadas.

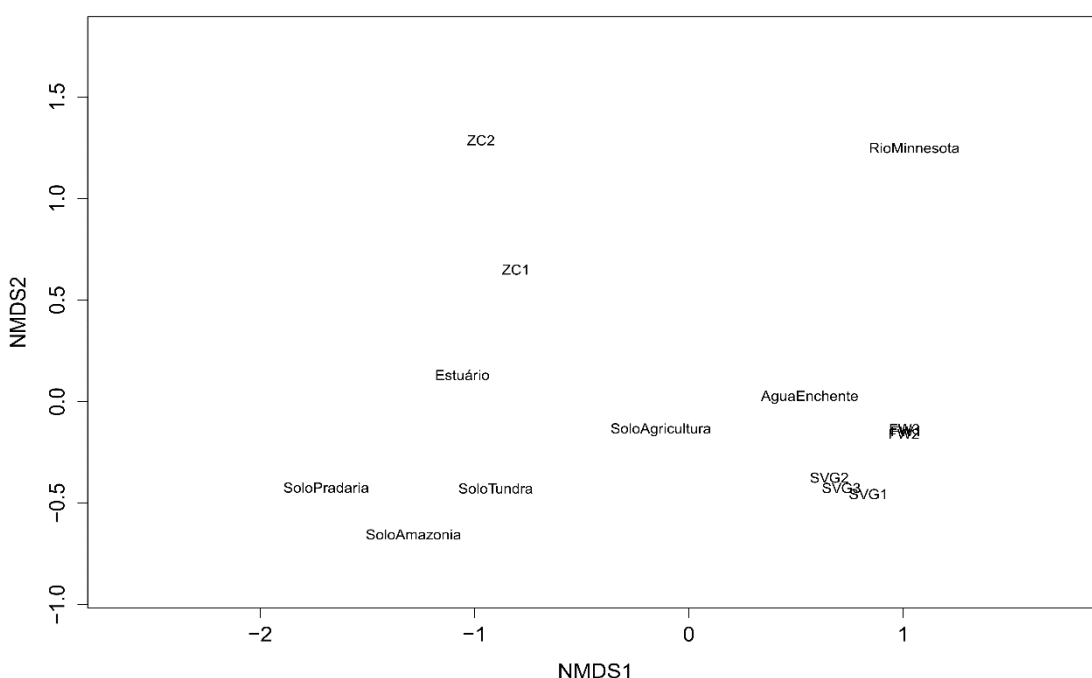


Figura 5 Escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) (Stress 0,07) do perfil funcional de 15 metagenomas contidos no MG-RAST, de acordo com o mais elevado nível hierárquico do *Kegg Orthology* (KO).

Discussão

Neste trabalho, investigou-se o microbioma e o perfil funcional de amostras de um solo de horta e água usada para irrigação, localizados na mesma área agrícola na fazenda da FPZSP. Nesta área, há aproximadamente

dez anos é realizado um processo de fertilização contínuo, no qual é utilizado um composto orgânico atípico, feito a partir de resíduos vegetais e animais. E os efeitos químicos e/ou microbiológicos deste composto, nunca haviam sido estudados anteriormente. Neste contexto, a maior preocupação neste trabalho era se o composto orgânico estava influenciando o solo, água ou ambos os ambientes. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos pela análise exploratória de dados do escalonamento multidimensional não métrico, ficou claro que o composto orgânico aparentemente não influencia nos atributos funcionais do solo e/ou da água avaliadas neste estudo. Porém, o fato que chamou a atenção, é que os resultados observados sugerem que a água utilizada para irrigação exerce maior influência nos atributos funcionais do solo, do que o composto orgânico em si. Uma vez que há claramente um grupo separado de metagenomas de solo no qual exclui-se a amostra SVG, e a mesma está relativamente próxima das amostras FW. Tal afirmação pode ser feita, assumindo que pela observação geográfica da localização do solo da horta e do córrego onde é captado água para irrigação, não há possibilidade de erosão do solo da horta para o recurso hídrico.

Na análise taxonômica alguns grupos microbianos mostraram ser similares ao nível de filo, entretanto com abundâncias relativas diferentes. Com foco apenas em Proteobacteria, observou-se que esse grupo foi mais abundante na água do que no solo, com dominância da classe Betaproteobacteria em FW (Figura 1B). Este resultado é consistente com outros estudos realizados utilizando amostras de água doce que reconhecem as Betaproteobacterias frequentemente dominantes em lagos de água doce e o maior grupo de bactérias estudadas pertencentes a esses ambientes (GHAL et al., 2011; NEWTON et al., 2011). Alguns membros desse grupo, por exemplo, as bactérias do gênero *Polynucleobater* e *Limnohabitans*, estão distribuídas no mundo todo em habitats de água doce e desempenham um importante papel ecológico na cadeia alimentar (KASALICKÝ et al., 2010; JEZBERA et al., 2011, 2012). Em contraste, observando-se os resultados obtidos para a amostra SVG, os filos bacterianos Actinobacteria e Firmicutes são os mais abundantes. De acordo com alguns estudos sobre solos em áreas agrícolas sob diferentes tipos de fertilização orgânica, Actinobacteria mostra-se como sendo um dos grupos mais abundantes presentes nas áreas (NIELSEN et al., 2014; HAMM et al., 2016). Bactérias do

filo Actinobactéria estão frequentemente associadas com a degradação de compostos de carbono recalcitrantes. Em um estudo de como a gestão de resíduos de culturas, plantio direto e aplicação de fertilizantes afetam a comunidade bacteriana e aqueles grupos envolvidos na degradação de resíduos de plantas (CHÁVEZ-ROMERO et al., 2016), os autores encontraram que os filos Actinobacteria e Firmicutes aumentaram em abundância com plantio direto.

Quando se realizou a análise taxonômica a nível de gênero bacteriano, foi possível verificar que em FW, o grupo mais abundante era o de *Polynucleobacter*, uma Betaproteobacteria comum de se encontrar em habitats de água doce e a bactéria mais estudada por pesquisadores do mundo todo neste tipo de habitat (GHAL et al., 2011; JEZBERA et al., 2011, 2012; NEWTON et al., 2011). Esta ultramicrobacteria oligotrófica não está associada a nenhum florescimento de algas, porém elas são especializadas na utilização de produtos da fotooxidação de produtos de substâncias húmicas, e algumas espécies usam luz como fonte de energia (HAHN et al., 2012; SALCHER, 2014). Entretanto, para as amostras SVG, o gênero mais abundante detectado foi *Bacillus*, que pertence ao segundo filo mais abundante deste estudo, Firmicutes. Este gênero bacteriano foi encontrado em ambas as amostras estudadas, SVG e FW, mas sua significância foi observada apenas para a amostra SVG. As bactérias pertencentes a este grupo são bem conhecidas e estudadas ao redor do mundo. Sua presença em áreas agrícolas é comum, além de serem capazes de produzirem vários biocompostos de importância em biotecnologia (KUMAR et al., 2013). Em especial, a espécie não patogênica *Bacillus megaterium*, vem sendo utilizada industrialmente por mais de 50 anos, uma vez que produz enzimas extracelulares muito úteis e incomuns (VARY et al., 2007; EPPINGER et al., 2011). Portanto, a partir desses resultados, ressalta-se que os dados obtidos neste estudo são consistentes com outros reportados em diversos outros realizados por pesquisadores ao redor do mundo sobre a diversidade bacteriana de amostras de solo e água doce (JEZBERA et al., 2011; SUL et al., 2013; NEWTON; MCLELLAN, 2015).

Além disso, o perfil funcional dos metagenomas de SVG e FW, determinados pela classificação hierárquica de genes preditos com base no *Kegg Orthology* (KO), mostrou que os ciclos biogeoquímicos relacionados ao nitrogênio e fósforo são similares entre os ambientes analisados (FW e SVG).

Entretanto, quando se relaciona o ciclo do enxofre, observa-se que a amostra SVG possui similaridade com ZC2.

Pela distribuição de genes relacionados com o ciclo do nitrogênio, observou-se uma grande abundância do gene *norB* (maior subunidade da enzima óxido nítrico redutase). Este gene catalisa a reação da redução de NO em N₂O, no qual representa uma reação incomum em biologia, uma vez que uma ligação N-N é formada. O gene *norB* pode ser encontrado em uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias desnitrificantes e não desnitrificantes (BRAKER; TIEDJE, 2003). O N₂O no processo de desnitrificação é um intermediário obrigatório, e por causa do escape de algumas dessas moléculas para atmosfera, a desnitrificação se tornou outro importante processo que contém fonte de gases de efeito estufa tanto em ecossistemas marinhos quanto terrestres, uma vez que o óxido nítrico contribui para o aquecimento global e mudanças climáticas (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010; JUNG et al., 2011). Apesar da importância do N₂O e *norB* gene, neste estudo não foram encontrados alguns dos outros genes responsáveis pela codificação das enzimas nitrato redutase (NAR) e nitrito redutase (NIR). Porém há a presença outros genes como, *napB*, *norC* e *nosZ*, entretanto os mesmos foram observados em baixa abundância, sugerindo deste modo, a partir dessas observações, que no caso das amostras SVG e FW, a via metabólica do nitrogênio está incompleta.

Referente aos genes do ciclo do enxofre, observou-se que *cysD* foi o mais abundante. Este gene está envolvido na biossíntese de cisteína, e também é parte da primeira reação assimilatória de sulfato, no qual auxilia na formação do adenililsulfato (APS). O APS é importante na redução assimilativa, pois é o intermediário da reação que irá formar sulfito e H₂S para então ser incorporado em compostos orgânicos de enxofre. As bactérias redutoras de sulfato (BRS) englobam um grupo diverso de micro-organismos anaeróbios obrigatórios que utilizam compostos orgânicos ou hidrogênio como doador de elétrons na redução do sulfato em sulfito (TANG; BASKARAN; NEMAT, 2009). Provavelmente, é devido a importância das BRS em degradar matéria orgânica, que as amostras SVG e ZC2 demonstraram perfis funcionais similares no que diz respeito ao ciclo do enxofre, uma vez que a alta concentração de matéria orgânica é evidente em ambas as amostras (Tabela S1 e Martins et al., 2013). Entretanto, apenas alguns

genes foram encontrados em grande abundância, o que também sugere, que esta via está incompleta.

Um inesperado resultado foi observado com relação ao ciclo do fósforo. Pois apesar de haver uma elevada concentração de fósforo em SVG, o gene que codifica a enzima 4-fitase foi encontrado apenas em ZC2. A 4-fitase (ou 6-fitase) é uma importante enzima fosfatase que catalisa a liberação de fosfato da molécula de mio-inositol hexaquifosfato. Em agricultura sustentável essas enzimas podem ser utilizadas na conversão do fitato do solo em fosfato, para então ser disponibilizado e absorvido pelas plantas, agindo como um fertilizante fosfatado natural (PATEL et al., 2010; TAN et al., 2014). Além disso, essa enzima desempenha um importante papel em ecossistemas aquáticos na reciclagem de fósforo orgânico (LIM et al., 2007).

Apesar do composto orgânico aplicado na área de estudo ser feito a partir de carcaça animal, foi possível inferir que em ambas as amostras, SVG e FW, há organismos comumente encontrados em áreas agrícolas ao redor do mundo (VAL-MORAES et al., 2011; NIELSEN et al., 2014; CHÁVEZ-ROMERO et al., 2016) e também em áreas urbanas (JEZBERA et al., 2012; NEWTON; MCLELLAN, 2015). Embora exista vários estudos relacionando o impacto positivo da utilização de compostos orgânicos para melhorar a qualidade do solo, praticamente não existem estudos sobre o efeito dessa aplicação em sistemas aquáticos próximos as áreas onde há o uso desse tipo de fertilização, e isso não pode ser negligenciado como afirmado pelo estudo de Le et al. (2016).

De acordo com nosso conhecimento, este é um dos poucos estudos descrevendo as propriedades microbianas e funcionais de amostras de solo e água sob fertilização com um composto orgânico feito a partir de resíduos vegetais e animais, incluindo carcaça. Os resultados reportados neste estudo, não conseguem explicar como o composto orgânico utilizado na área, influencia no atual microbioma do solo ou água. Entretanto, os resultados aqui explorados, forneceram algumas evidências sobre a ecologia bacteriana da área agrícola em estudo. As análises da taxonomia referente aos ciclos biogeoquímicos mostraram que não há micro-organismos em comum entre as amostras SVG e FW com a do composto orgânico (ZC). Análise exploratória de dados, utilizando NMDS, mostra uma distância significativa das amostras SVG e FW da ZC seguindo índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. Deste modo, a partir dos

estudos obtidos nesse estudo, pode-se sugerir que a água utilizada para irrigação exerce maior influência nos atributos funcionais do solo do que o composto orgânico aplicado na área. Uma vez que, pelo agrupamento hierárquico esperava-se que a amostra SVG estivesse agrupada juntamente com as outras amostras de solo selecionadas a fins comparativos. E pelo contrário, a amostra SVG agrupou-se com as amostras de FW. A partir disso, vale ressaltar então a qualidade da água usada para fins de irrigação, onde se observou que FW possui ótimas condições para uso não possuindo qualquer evidência de contaminação alóctone, do composto orgânico ou do solo. Entretanto, para garantir tal afirmação, análises futuras são necessárias, com o intuito de identificar singularidades de cada ambiente. Podendo ser realizados experimentos controlados em casa de vegetação, micro ou mesocosmos.

Conclusão

Este estudo forneceu a base para compreensão da estrutura da comunidade microbiana de uma área sob grande atividade agrícola. Onde se utiliza irrigação regular, e fertilização com um composto orgânico feito a partir de carcaça animal. Tanto o solo da horta quanto a água usada para irrigação demonstraram possuir diversidade bacteriana de organismos comumente encontrados em outras áreas agrícolas. Além disso, a análise do metabolismo dos ciclos biogeoquímicos ilustrou um aspecto particular importante desses ambientes. Através do exposto, é possível também sugerir que a água usada para irrigação na área influencia as propriedades funcionais do solo da horta, ressaltando a importância da verificação constante da qualidade de sistemas aquáticos além de sua proteção. Ademais, as amostras analisadas neste estudo, mostraram também um grande potencial biotecnológico que será explorado em trabalhos futuros. Fato esse observado devido aos aspectos taxonômicos e funcionais.

Referências bibliográficas

ANDREOTE, F. D.; JIMÉNEZ, D. J.; CHAVES, D.; DIAS, A. C. F.; LUVIZOTTO, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; LOPEZ, M. V.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; DE MELO, I. S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

ANDREWS, S. **FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.** Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 1 mar. 2015.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington, DC. 2005

BRAKER, G.; TIEDJE, J. M. Nitric Oxide Reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3476–3483, 2003

CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192–196, 2010.

CHÁVEZ-ROMERO, Y.; NAVARRO-NOYA, Y. E.; REYNOSO-MARTÍNEZ, S. C.; SARRIA-GUZMÁN, Y.; GOVAERTS, B.; VERHULST, N.; DENDOOVEN, L.; LUNA-GUIDO, M. 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. **Soil and Tillage Research**, v. 159, p. 1–8, 2016.

DAHAN, O.; BABAD, A.; LAZAROVITCH, N.; RUSSAK, E. E.; KURTZMAN, D. Nitrate leaching from intensive organic farms to groundwater. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 18, n. 1, p. 333–341, 2014.

EPPINGER, M.; BUNK, B.; JOHNS, M. A.; EDIRISINGHE, J. N.; KUTUMBAKA, K. K.; KOENIG, S. S. K.; CREASY, H. H.; ROISOVITZ, M. J.; RILEY, D. R.; DAUGHERTY, S.; MARTIN, M.; ELBOURNE, L. D. H.; PAULSEN, I.; BIEDENDIECK, R.; BRAUN, C.; GRAYBURN, S.; DHINGRA, S.; LUKYANCHUK, V.; BALL, B.; UL-QAMAR, R.; SEIBEL, J.; BREMER, E.; JAHN, D.; RAVEL, J.; VARY, P. S. Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 16, p. 4199–213, 2011.

GHAI, R.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; MCMAHON, K. D.; TOYAMA, D.; RINKE, R.; DE OLIVEIRA, T. C. S.; GARCIA, J. W.; DE MIRANDA, F. P.; HENRIQUE-SILVA, F. Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

HAHN, M. W.; SCHEUERL, T.; JEZBEROVÁ, J.; KOLL, U.; JEZBERA, J.; ŠIMEK, K.; VANNINI, C.; PETRONI, G.; WU, Q. L. The passive yet successful way of planktonic life: genomic and experimental analysis of the ecology of a free-living polynucleobacter population. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e32772, 2012.

HAMM, A. C.; TENUTA, M.; KRAUSE, D. O.; OMINSKI, K. H.; TKACHUK, V. L.; FLATEN, D. N. Bacterial communities of an agricultural soil amended with solid pig and dairy manures, and urea fertilizer. **Applied Soil Ecology**, v. 103, p. 61–71, 2016.

JEZBERA, J.; JEZBEROVÁ, J.; BRANDT, U.; HAHN, M. W. Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* subspecies *asymbioticus* results from ecological diversification. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 922–931, 2011.

JEZBERA, J.; JEZBEROVÁ, J.; KOLL, U.; HORŇÁK, K.; ŠIMEK, K.; HAHN, M. W. Contrasting trends in distribution of four major planktonic betaproteobacterial groups along a pH gradient of epilimnia of 72 freshwater habitats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, n. 2, p. 467–479, 2012.

JUNG, J.; YEOM, J.; KIM, J.; HAN, J.; LIM, H. S.; PARK, H.; HYUN, S.; PARK, W. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 10, p. 1018–1026, 2011.

KALBASI-ASHTARI, A.; MUKHTAR, S.; HAWKINS, S. E.; AUVERMANN, B. W. Carcass composting for management of farm mortalities : a review. **Compost Science & Utilization**, v. 13, n. 3, p. 180–193, 2005.

KANEHISA, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KASALICKÝ, V.; JEZBERA, J.; ŠIMEK, K.; HAHN, M. W. *Limnohabitans planktonicus* sp. nov. and *Limnohabitans parvus* sp. nov., planktonic betaproteobacteria isolated from a freshwater reservoir, and emended description of the genus *Limnohabitans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2710–2714, 2010.

KUMAR, P.; PATEL, S. K. S.; LEE, J.-K.; KALIA, V. C. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1543–1561, 2013.

LE, H. T.; HO, C. T.; TRINH, Q. H.; TRINH, D. A.; LUU, M. T. N.; TRAN, H. S.; ORANGE, D.; JANEAU, J. L.; MERROUNE, A.; ROCHELLE-NEWALL, E.; POMMIER, T. Responses of aquatic bacteria to terrestrial runoff: effects on community structure and key taxonomic groups. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

LIM, B. L.; YEUNG, P.; CHENG, C.; HILL, J. E. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. **The ISME journal**, v. 1, n. 4, p. 321–30, 2007.

LOCEY, K. J.; LENNON, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 21, p. 201521291, 2016.

MARTINS, L. F.; ANTUNES, L. P.; PASCON, R. C.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; DIGIAMPIETRI, L. A.; BARBOSA, D.; PEIXOTO, B. M.; VALLIM, M. A.; VIANANIERO, C.; OSTROSKI, E. H.; TELLES, G. P.; DIAS, Z.; DA CRUZ, J. B.; JULIANO, L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DA SILVA, A. M.; SETUBAL, J. C. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the são paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61928, 2013.

MEDINA, J.; MONREAL, C.; BAREA, J. M.; ARRIAGADA, C.; BORIE, F.; CORNEJO, P. Crop residue stabilization and application to agricultural and degraded soils: A review. **Waste Management**, v. 42, p. 41–54, 2015.

MENDES, L. W.; KURAMAE, E. E.; NAVARRETE, A. a; VAN VEEN, J. a; TSAI, S. M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME journal**, p. 1577–1587, 2014.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; ETAL. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylo- genetic and functional analysis of metagenomes. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 386, 2008.

NEWTON, R. J.; JONES, S. E.; EILER, A.; MCMAHON, K. D.; BERTILSSON, S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n.1, p.14-49, 2011.

NEWTON, R. J.; MCLELLAN, S. L. A unique assemblage of cosmopolitan freshwater bacteria and higher community diversity differentiate an urbanized estuary from oligotrophic Lake Michigan. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–13, 2015.

NIELSEN, S.; MINCHIN, T.; KIMBER, S.; VAN ZWIETEN, L.; GILBERT, J.; MUNROE, P.; JOSEPH, S.; THOMAS, T. Comparative analysis of the microbial communities in agricultural soil amended with enhanced biochars or traditional fertilisers. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 191, p. 73–82, 2014

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; WAGNER, H. **Package “vegan”. R package ver. 2.0–8**, p. 254, 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/package=vegan>>.

PARIKH, S. J. Soil: the foundation of agriculture. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, p. 2, 2012.

PATEL, K. J.; VIG, S.; NARESH KUMAR, G.; ARCHANA, G. Effect of transgenic rhizobacteria overexpressing *Citrobacter braakii* appA on phytate-P availability to mung bean plants. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 11, p. 1491–9, 2010.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, p. D590-6, 2013.

SALCHER, M. M. Same but different: Ecological niche partitioning of planktonic freshwater prokaryotes. **Journal of Limnology**, v. 73, n. 1, p. 74–87, 2014.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing *mothur*: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–41, 2009.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863–864, 2011.

SCOTTI, R.; PANE, C.; SPACCINI, R.; PALESE, A. M.; PICCOLO, A.; CELANO, G.; ZACCARDELLI, M. On-farm compost: a useful tool to improve soil quality under intensive farming systems. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 13–23, 2016.

SUL, W. J.; ASUMING-BREMPONG, S.; WANG, Q.; TOURLOUSSE, D. M.; PENTON, C. R.; DENG, Y.; RODRIGUES, J. L. M.; ADIKU, S. G. K.; JONES, J. W.; ZHOU, J.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 33–38, 2013.

TAN, H.; MOOIJ, M. J.; BARRET, M.; HEGARTY, P. M.; HARINGTON, C.; DOBSON, A. D. W.; O'GARA, F. Identification of novel phytase genes from an agricultural soil-derived metagenome. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 113–8, 2014.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 73–94, 2009.

VAL-MORAES, S. P.; MARCONDES, J.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 1997–2003, 2011.

VAN RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Chemical analysis for the evaluation of fertility of tropical soils**. Agronomic Institute, Campinas, 2001.

VARY, P. S.; BIEDENDIECK, R.; FUERCH, T.; MEINHARDT, F.; ROHDE, M.; DECKWER, W.-D.; JAHN, D. *Bacillus megaterium*---from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 957–967, 2007.

WANG, Y.; NAUMANN, U.; WRIGHT, S. T.; WARTON, D. I. Mvabund- an R package for model-based analysis of multivariate abundance data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 471–474, 2012.

WEI, Y.; ZHAO, Y.; XI, B.; WEI, Z.; LI, X.; CAO, Z. Changes in phosphorus fractions during organic wastes composting from different sources. **Bioresource technology**, v. 189, p. 349–56, 2015.

YE, J.; ZHANG, R.; NIELSEN, S.; JOSEPH, S. D.; HUANG, D.; THOMAS, T. A combination of biochar-mineral complexes and compost improves soil bacterial processes, soil quality, and plant properties. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 372, 2016.

ZHANG, Y. L.; DAI, J. L.; WANG, R. Q.; ZHANG, J. Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. **European Journal of Soil Biology**, v. 44, n. 1, p. 84–91, 2008.

Informação suplementar

Tabela S1. Contagem dos filios bacterianos referentes aos metagenomas do solo da horta (SVG1, SVG2, SVG3) e da água usada para irrigação (FW1, FW2, FW3). Os valores apresentados de cada metagenoma, são os normalizados através de subamostragem utilizando o software Mothur. Para o teste de significância utilizou-se reamostragem de Monte Carlo e p-valores ajustados dos dados previamente ajustados para MGLM. Os dados estão classificados em ordem crescente do p-valor.

| Filo | SVG1 | SVG2 | SVG3 | FW1 | FW2 | FW3 | p-valor |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|---------|
| Acidobacteria | 81 | 46 | 68 | 1 | 1 | 0 | 0,001 |
| Actinobacteria | 2554 | 2379 | 2605 | 552 | 393 | 382 | 0,001 |
| Firmicutes | 1364 | 1165 | 1195 | 33 | 6 | 22 | 0,001 |
| Planctomycetes | 72 | 59 | 62 | 8 | 4 | 4 | 0,001 |
| Bacteroidetes | 49 | 83 | 56 | 381 | 1443 | 1011 | 0,002 |
| Chlamydiae | 15 | 10 | 11 | 3 | 4 | 3 | 0,002 |
| Chloroflexi | 34 | 31 | 26 | 2 | 0 | 0 | 0,002 |
| Cyanobacteria | 13 | 20 | 14 | 72 | 58 | 43 | 0,002 |
| Proteobacteria | 774 | 890 | 728 | 2645 | 1790 | 1714 | 0,002 |
| Gemmatimonadetes | 11 | 21 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0,004 |
| Deinococcus-Thermus | 1 | 3 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0,038 |
| Thermotogae | 3 | 7 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0,182 |
| Synergistetes | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0,34 |
| Verrucomicrobia | 20 | 31 | 39 | 24 | 4 | 14 | 0,543 |
| Lentisphaerae | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0,622 |
| Deferribacteres | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,802 |
| Nitrospirae | 8 | 7 | 23 | 0 | 5 | 10 | 0,805 |
| Dictyoglomi | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0,964 |
| Spirochaetes | 0 | 1 | 9 | 12 | 3 | 7 | 0,964 |
| Tenericutes | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0,964 |
| Chlorobi | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0,965 |
| Fusobacteria | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| unclassified Bacteria | 1128 | 1387 | 1290 | 2406 | 2428 | 2929 | 1 |

Tabela S2. Contagem dos gêneros bacterianos referentes aos metagenomas do solo da horta (SVG1, SVG2, SVG3) e da água usada para irrigação (FW1, FW2, FW3). Os valores apresentados de cada metagenoma, são os normalizados através de subamostragem utilizando o software Mothur. Para o teste de significância utilizou-se reamostragem de Monte Carlo e p-valores ajustados dos dados previamente ajustados para MGLM. Apenas os gêneros que apresentaram p-valor < 0,05 são mostrados. Os dados estão classificados em ordem crescente do p-valor.

| Gênero | SVG1 | SVG2 | SVG3 | FW1 | FW2 | FW3 | p-valor |
|-----------------------|------|------|------|-----|-----|-----|---------|
| Acidimicrobium | 14 | 10 | 20 | 1 | 1 | 1 | 0,001 |
| Acidovorax | 0 | 0 | 0 | 53 | 190 | 172 | 0,001 |
| Aeromicrobium | 14 | 24 | 13 | 1 | 0 | 1 | 0,001 |
| Albidiferax | 1 | 3 | 2 | 19 | 15 | 25 | 0,001 |
| Bacillus | 564 | 658 | 602 | 8 | 0 | 5 | 0,001 |
| Bacteroides | 0 | 0 | 0 | 22 | 15 | 10 | 0,001 |
| Brevibacillus | 14 | 12 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0,001 |
| Candidatus Aquiluna | 0 | 0 | 0 | 27 | 32 | 35 | 0,001 |
| Candidatus Koribacter | 35 | 22 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0,001 |
| Candidatus Rhodoluna | 0 | 0 | 0 | 196 | 200 | 128 | 0,001 |
| Chitinophaga | 4 | 6 | 2 | 41 | 43 | 55 | 0,001 |
| Conexibacter | 227 | 170 | 215 | 1 | 0 | 1 | 0,001 |
| Cytophaga | 2 | 6 | 1 | 66 | 112 | 78 | 0,001 |
| Dolichospermum | 0 | 0 | 0 | 16 | 21 | 18 | 0,001 |
| Flectobacillus | 0 | 0 | 0 | 53 | 155 | 67 | 0,001 |
| Flexibacter | 0 | 0 | 0 | 39 | 77 | 50 | 0,001 |
| Frankia | 53 | 97 | 54 | 4 | 1 | 4 | 0,001 |
| Gemmata | 15 | 16 | 11 | 1 | 0 | 2 | 0,001 |
| Isosphaera | 19 | 10 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0,001 |
| Lactobacillus | 15 | 12 | 17 | 2 | 0 | 2 | 0,001 |
| Leifsonia | 13 | 13 | 7 | 48 | 57 | 88 | 0,001 |
| Leucobacter | 0 | 0 | 0 | 42 | 27 | 19 | 0,001 |

| | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| Micrococcus | 33 | 35 | 58 | 0 | 0 | 1 | 0,001 |
| Mycobacterium | 164 | 191 | 239 | 20 | 6 | 4 | 0,001 |
| Paenibacillus | 85 | 76 | 53 | 0 | 0 | 1 | 0,001 |
| Pirellula | 9 | 15 | 16 | 1 | 0 | 1 | 0,001 |
| Polynucleobacter | 0 | 0 | 0 | 858 | 382 | 649 | 0,001 |
| Porphyromonas | 0 | 0 | 0 | 9 | 7 | 7 | 0,001 |
| Pseudomonas | 5 | 2 | 6 | 43 | 132 | 109 | 0,001 |
| Salinispora | 9 | 7 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0,001 |
| Streptomyces | 320 | 173 | 233 | 7 | 9 | 4 | 0,001 |
| Thermoanaerobacter | 33 | 31 | 44 | 1 | 0 | 1 | 0,001 |
| Thermobifida | 18 | 24 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0,001 |
| Unclassified (derived from Betaproteobacteria) | 21 | 26 | 26 | 580 | 439 | 365 | 0,001 |
| Unclassified (derived from Comamonadaceae) | 0 | 0 | 0 | 23 | 41 | 20 | 0,001 |
| Actinoplanes | 31 | 29 | 44 | 3 | 0 | 0 | 0,002 |
| Alicyclobacillus | 41 | 18 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0,002 |
| Candidatus Solibacter | 39 | 20 | 17 | 1 | 0 | 1 | 0,002 |
| Clostridium | 21 | 20 | 33 | 6 | 4 | 6 | 0,002 |
| Comamonas | 0 | 0 | 0 | 26 | 21 | 67 | 0,002 |
| Nocardioides | 466 | 525 | 593 | 7 | 0 | 3 | 0,002 |
| Rhodospirillum | 0 | 0 | 0 | 6 | 4 | 9 | 0,002 |
| Symbiobacterium | 21 | 22 | 60 | 0 | 0 | 0 | 0,002 |
| Terrimonas | 36 | 40 | 37 | 81 | 138 | 106 | 0,002 |
| Xenophilus | 1 | 1 | 0 | 17 | 8 | 14 | 0,002 |
| Heliobacterium | 4 | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0,003 |
| Lysinibacillus | 43 | 64 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0,005 |
| Micromonospora | 404 | 199 | 77 | 8 | 1 | 3 | 0,005 |
| Kyrpidia | 5 | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0,006 |
| Thermoactinomyces | 11 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0,007 |
| Thiothrix | 0 | 0 | 0 | 9 | 6 | 18 | 0,007 |
| Unclassified (derived from Bacteroidetes) | 0 | 0 | 0 | 9 | 32 | 35 | 0,007 |

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Blastopirellula | 4 | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0,008 |
| Corallococcus | 7 | 7 | 7 | 1 | 1 | 0 | 0,009 |
| Planomonospora | 10 | 4 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0,01 |
| Pelomonas | 0 | 0 | 0 | 12 | 18 | 5 | 0,015 |
| Salinibacter | 5 | 8 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0,019 |
| Arthrobacter | 94 | 114 | 70 | 2 | 8 | 0 | 0,022 |
| Agromyces | 30 | 6 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0,034 |
| Anaeromyxobacter | 5 | 8 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0,034 |
| Cryobacterium | 0 | 0 | 1 | 7 | 20 | 12 | 0,036 |
| Intrasporangium | 5 | 8 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0,036 |
| Unclassified (derived from Bacteria) | 1123 | 1329 | 1284 | 2213 | 2130 | 2284 | 0,04 |
| Acidithiobaculum | 12 | 44 | 104 | 0 | 0 | 0 | 0,042 |
| Methylocystis | 3 | 1 | 5 | 14 | 11 | 18 | 0,042 |

CAPÍTULO 3 – Production, characterization and bioemulsifying activity of an exopolysaccharide produced by *Sphingomonas* sp. isolated from freshwater

Aylan Kener Meneghine, Cristiane Moretto, Tereza Cristina Luque Castellane, Lúcia Maria Carareto Alves

Artigo publicado na revista “Journal of Polymers and the Environment” (Springer).
doi:10.1007/s10924-016-0878-0

Submetido em: 20/05/2016, aceito em: 19/10/2016, publicado em: 09/11/2016.

Abstract

This study aimed to evaluate the emulsion stability of solutions containing exopolysaccharide and culture medium of a *Sphingomonas* sp. strain with various hydrophobic compounds. The exopolysaccharide characterized belongs to a sphingan group, however, not being a gellan gum as produced by certain *Sphingomonas* strains. In general, the emulsifying indexes found in this study were above 70% for gasoline, hexane, kerosene and used frying oil. Nonetheless, the best results were achieved in kerosene solutions, which showed an index of 80% after 24 h, remaining stable for more than 168 hours in combinations with various EPS concentrations. Interestingly, diesel oil best results were singly achieved in solution pH of 11, showing an index of around 65%. Furthermore, hexane obtained an index of 100% after 24 h when culture medium was used. Thus, these findings highlight the use of EPS as a potential bioemulsifier agent to enhance hydrocarbon degradation and emulsification effects in environmental biotechnology.

Key words: bioemulsifier, biopolymer, diesel, kerosene.

Introduction

Bioemulsifier molecules have recently received increasing attention because of their advantages over synthetic counterparts, which include low toxicity, high biodegradability, better environmental compatibility, increased foaming and selectivity, high specific activity at extreme temperatures, pH, and salinity [1].

Sphingomonas is bacterial group widely spread in nature and commonly found in soil and aquatic environments. These microorganisms are able to survive and grow at low temperature, low nutrient concentration and toxic environments, being characterized, among other things, by a high capacity to degrade environmentally hazardous compounds [2, 3]. Several studies have reported production of extracellular polymers by different strains of *Sphingomonas* [3, 4]. Among them, the 'sphingans', which are structurally related exopolysaccharides (EPS) secreted by members of the genus *Sphingomonas*; of which, the 'gellan' is a multifunctional gelling agent highly produced by non-pathogenic strains, and currently, is one of the most important emulsifiers commercially produced, as well as xanthan gum that is produced by *Xanthomonas campestris* [5, 6].

Recently, there has been renewed interest in polysaccharides, particularly microbial-produced ones, since they have high relevance in industrial and environmental applications. These water-soluble carbohydrate polymers have a wide range of functional properties. They are able to modify aqueous solution properties by thickening, being also used as chelating, emulsifier, or stabilizer agents [7, 8]. In recent years, many microbial polymers have been used as bioemulsifiers due to their ability to stabilize emulsions between water and hydrophobic compounds [9].

In 1995, Ashtaputre and Shah studied the emulsifying activity of an exopolysaccharide produced by *Sphingomonas paucimobilis*, showing most significant results for polysaccharides in xylene and kerosene. These authors demonstrated EPS stability at different temperatures, pH, salinity and times. So far, several other papers have been reporting the characteristics of exopolysaccharides produced by *Sphingomonas* strains [4, 11], including gellan gum production [5, 12–14]. However, there is a lack of researches on the emulsifying activity of EPS produced by *Sphingomonas*, as cited above.

In order to understand EPS importance and major applications, mainly those produced by *Sphingomonas* strains, which have been largely used in drug and food industries, our study sought to evaluate the ability of an exopolysaccharide and culture media produced by a wild-type strain of *Sphingomonas* sp. isolated from freshwater to stabilize emulsions with several hydrophobic compounds.

Material and methods

Microorganism

For this study, we used a wild-type bacterial strain isolated from stream freshwater, which is intensively used in crop irrigation. Aside from the agricultural activity influence, this stream also receives effluents from a zoo farm located in the city of Araçoiaba da Serra - SP, Brazil.

The isolate was previously identified by sequence analysis of the 16S rDNA gene and, a further BlastN analyses classified as *Sphingomonas* sp. those bacteria primarily designed as C7 (KT372350) (Figure 1).

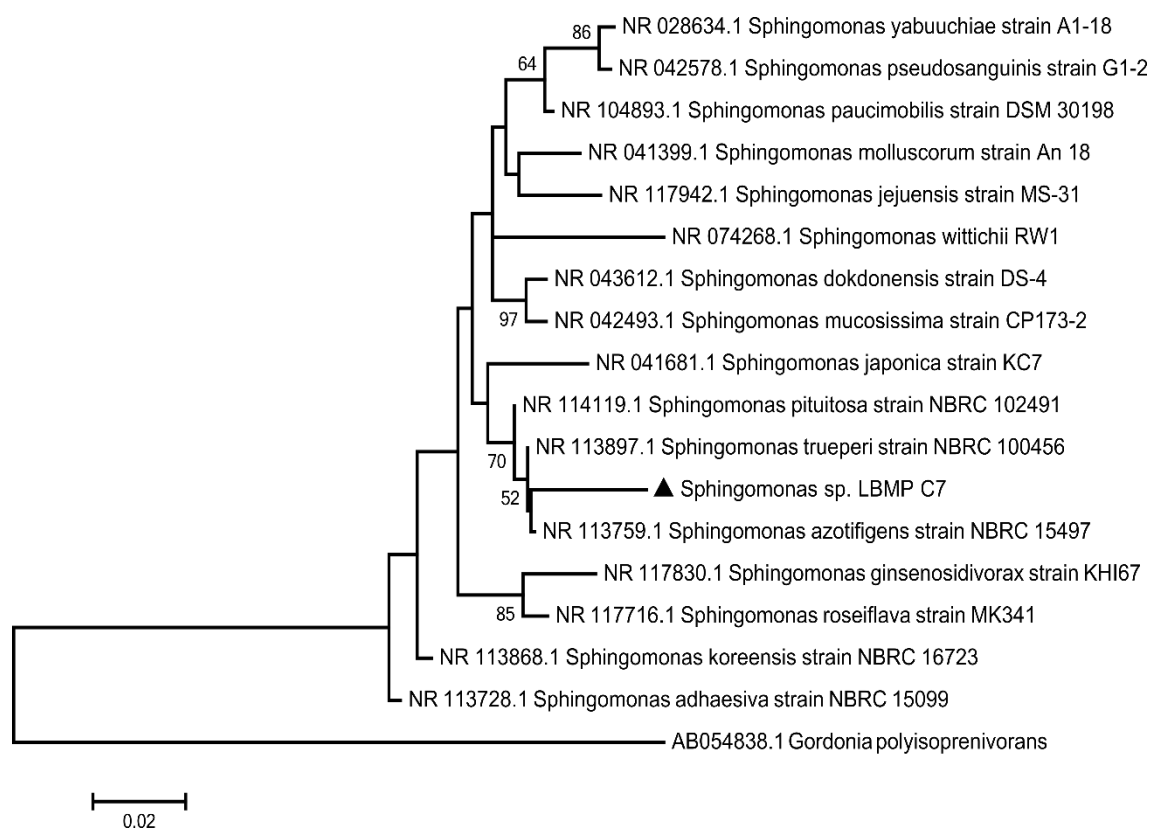


Fig. 1 Classification of 16S rRNA gene sequences of the *Sphingomonas* sp. LBMP C7. The analyses were conducted using the Maximum Likelihood method, with the K2-parameter nucleotide substitution matrix and a bootstrap of 1000 replicates. The figure displays only bootstrap values of at least $\geq 50\%$. Scale: 0.02 nucleotide substitutions per position.

For routine isolate growth and evaluations of emulsifying activities, the bacterial isolate was streaked in a PGYA medium containing glycerol (10 g L^{-1}) as carbon source and incubated for 24 h at 30°C . After 24 h, the inoculating strain was cultivated in a 250-mL flask (100 mL of medium) containing PGYL liquid medium on rotary shaker at 150 rpm for 24 h. At this time, a suspension with an optical density at 600nm (OD_{600}) of 2.5 was obtained. The temperature was maintained at 30°C . Aliquots of the corresponding culture were transferred to 1000-mL Erlenmeyer flasks containing 500 mL of modified half-liquid PSYL medium (registration PI0304053-4) containing glucose (10 g L^{-1}) as carbon source and incubated for 120 h at 150 rpm and 30°C .

EPS Production

For EPS production evaluation, pre-inocula were initially prepared from cultures cultivated on solid PGYA medium, containing glycerol (10 g L^{-1}) as a carbon source. After 24-h incubation at 30°C , inoculated strain was cultivated in 125-mL flasks (20 mL of medium in each) with PGYL liquid medium and left on a rotary shaker (innova 4335, New Brunswick Scientific) at 140 rpm for 30 h. Then, we obtained a suspension with an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.3 at a temperature remained at 30°C . Subsequently, aliquots of the corresponding cultures were transferred into 1000-mL Erlenmeyer flasks containing 500-mL of half-liquid PSYL medium at a final concentration of 0.10% (v/v) and incubated for 48 h at 150 rpm and 30°C .

EPS Extraction

For EPS extraction, cold 96% ethanol was added to the supernatant obtained from centrifugation at a 1:3 (v/v) ethanol: supernatant ratio to precipitate the EPS [15]. At this stage, it was promptly possible to observe precipitate formation. This precipitate was washed several times with ethanol, which was subsequently evaporated. The solvent precipitation also achieved a partial polymer purification by eliminating soluble components from culture media [16].

EPS production was measured in a precision scale after drying the precipitated product in a Hetovac VR-1 lyophilizer until constant weight (grams of EPS per liter of culture medium). The results were presented as means \pm standard error.

EPS monosaccharide composition by RP-HPLC

For EPS monosaccharide composition analysis, raw EPS preparation was identified by RP-HPLC using the 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone monomer chemical identification methodology with modifications accordingly to Castellane et al. [17].

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

EPS characterization was finished by acquisition of FTIR absorption spectra. Pellets for infrared analysis were obtained by grinding 1 mg of EPS. The FTIR spectra were obtained with a Paragon 1000, Perkin–Elmer spectrometer (4000–400 cm^{-1} , 4 cm^{-1} of spectral resolution, and 64 scans). The spectra were baseline and offset corrected from 3000 to 2800 cm^{-1} and from 1800 to 900 cm^{-1} , and normalized by the intensity of the amide II peak (intensity=100) at 1550 cm^{-1} [18].

Surface Tension Measurement

Surface tension measurements were performed by the du Nöuyring method using a Krüs Tensiometer K12 (Krüs, Helsinki, Finland) on EPS solubilized in ultra-pure water at concentrations ranging from 0 to 5.0 mg/mL. All determinations were performed in three replicates.

Emulsifying Activity

EPS capacity to stabilize emulsions using various hydrophobic compounds was tested as described by Freitas et al. [9]. Emulsion formation and stabilization were

assessed for four different EPS concentrations. Certain amounts of EPS aqueous solutions (0.5, 1, 2 and 3 mg mL⁻¹) were mixed with each hydrophobic compound (3:2, v/v ratio) and stirred in the vortex. After 24 and 168 h, we measured emulsification index using the following equation for both times: $E_x = (he/hT) \times 100$; wherein, E_x is the emulsification index after stirring for 24 (E_{24}) and 168 (E_{168}) hours, he is the emulsion height (in mm), and hT is the mixture height (in mm). Tested compounds consisted of hydrocarbons as diesel oil, hexane, gasoline, kerosene, which were purchased at local market; and used frying oil, which was provided by a local restaurant. We also assessed emulsion formation and stabilization of culture media mixed with each hydrophobic compound (3:2, v/v ratio) and stirred in the vortex as described above.

Thermal and pH stability

Emulsions were heated in a water bath at 80 °C for 1 hour to study the heat effects on EPS emulsifying activities. The samples were allowed to stand at room temperature for 1h after treatment and, before index measurements, we compared these results to the corresponding values taken before heating.

Next, diesel oil was selected for pH analysis. Therefore, we prepared four EPS solutions of 1 mg mL⁻¹ at different pH values (3, 5, 9 and 11). All emulsions were mixed and measured as previously described and then compared with the corresponding values obtained prior to analysis.

Data analysis

All determinations reported here were performed in triplicate, and results were presented as mean values. Data underwent analysis of variance (ANOVA), and means were compared by the Tukey's test ($p < 0.05$). For the analyses, we used the R software (<https://cran.r-project.org/>).

Results

EPS production by *Sphingomonas* sp. strain C7 was quantified by culture ethyl alcohol precipitation being expressed in lyophilized weight per liter. Interestingly, we obtained 3.55 g L^{-1} of EPS in a final pH growth of 6.5, after 48 h. Then, the EPS was diluted (m/v) in ultra-pure water at different concentrations, in which we reached a pH around neutrality (pH 7.3).

From FT-IR spectroscopy, we could clearly demonstrate EPS high intensity of acetate and carboxylate groups (Figure 2), at peaks of 1730 cm^{-1} and 1455 cm^{-1} , respectively. In addition, HPLC outcomes revealed EPS is a heteropolysaccharide composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid, glucose, galactose and xylose (Figure 3). Among them, glucose was predominant representing 51%. However, there was no significant reduction in the surface tension of the EPS (data not shown). The surface tension of water (75 mN/m) was reduced around 10%, whereas no further decrease was observed.

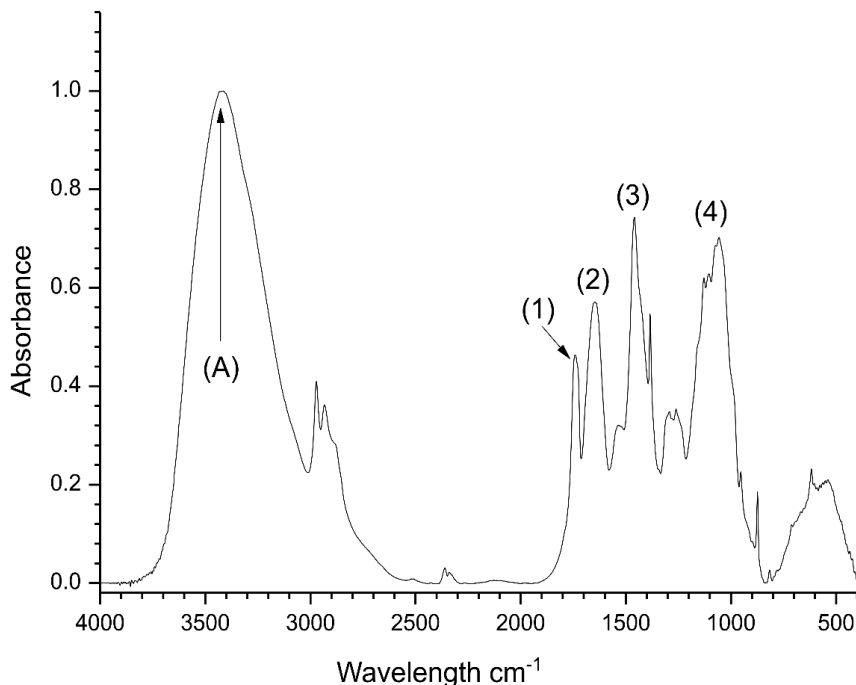


Fig. 2 Gram-negative bacterium *Sphingomonas* sp. representative FT-IR absorbance spectrum. The figure displays the extracted exopolysaccharide intensities, the

numbers highlighted represent the biomolecule biochemical bounds: (A) 3425 cm⁻¹ O-H bound, (1) 1730 cm⁻¹ C=O bound like acetate ester, (2) 1640 cm⁻¹ O-H bounds like carbohydrates, (3) 1455 cm⁻¹ COO⁻ bounds (carboxylate) from pyruvate or glucuronic acids, (4) 1085 cm⁻¹ C-O bounds common for carbohydrates.

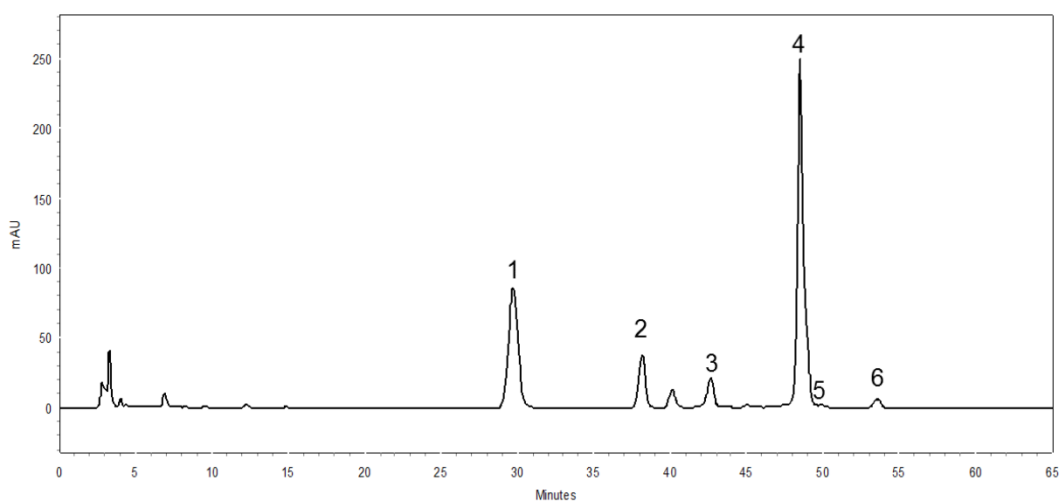


Fig. 3 EPS sample monosaccharide analysis using the PMP derivative HPLC-UV method of the EPS acid hydrolysate. The chromatographs of the EPS from show peaks for (1) mannose, (2) rhamnose, (3) glucuronic acid, (4) glucose, (5) galactose and (6) xylose.

It is noteworthy mention that the emulsifying activities shown in Table 1 became consistent emulsions after 24 h for some of the hydrophobic substrates, such as gasoline, hexane, kerosene and used frying oil, either at an EPS concentration of 0.5 or 1 mg mL⁻¹.

We considered as best results those of emulsifying indexes $E_{24} \geq 70\%$. For gasoline, the best result of emulsion stability was reached after 168 h using 3 mg mL⁻¹ of EPS, having an index $E_{24} > 80\%$. Yet for hexane, it was reached an $E_{24} \geq 75\%$, using an EPS concentration of 2 mg mL⁻¹; however, after 168 h, this solution was no longer stable. Conversely, the same hydrocarbon obtained an $E_{24} > 90\%$ after 24 hours using 3 mg mL⁻¹ of EPS; aside from that, after 168 h, this index raised to 100% ($E_{168} = 100\%$). For used frying oil, the best emulsions were reached for concentrations of 1 and 2 mg mL⁻¹ of EPS ($E_{24} > 80\%$), nevertheless being unstable. Finally, for kerosene,

the best result ($E_{24} > 80\%$) was achieved using EPS concentrations of 1 and 3 mg mL⁻¹, though the first emulsion was improved after 168 h, while the second remained stable. Yet for 2 mg mL⁻¹ of the same solution, emulsion remained stable, with an $E_{24} > 90\%$ (Table 1).

Table 1. Emulsifying activity after 24 hours (E_{24}) and 168 hours (E_{168}) using hydrocarbon (diesel, gasoline, hexane and kerosene) and residual oils (used frying oil) at different EPS concentrations. Data are presented as means and standard deviation.

| Oil | EPS concentration (mg mL ⁻¹) | E_{24} (%) | E_{168} (%) |
|-----------------|---|--------------------|-------------------|
| Diesel | 0.5 | 17.7 ± 4 | 10.9 ± 3 |
| Diesel | 1 | 28.4 ± 13.9 | 18.9 ± 8.1 |
| Diesel | 2 | 61.6 ± 3.2 | 56.2 ± 0.9 |
| Diesel | 3 | 53.8 ± 1.8 | 52.7 ± 1.3 |
| Gasoline | 0.5 | 59 ± 5 | 51.4 ± 0.1 |
| Gasoline | 1 | 55.3 ± 1.3 | 53.3 ± 0.7 |
| Gasoline | 2 | 63.1 ± 0.8 | 57.9 ± 5.3 |
| Gasoline | 3 | 88.3 ± 5.3 | 84.3 ± 4.3 |
| Hexane | 0.5 | 26.3 ± 9.5 | 33.9 ± 14.5 |
| Hexane | 1 | 51.5 ± 6 | 61.8 ± 7 |
| Hexane | 2 | 75.5 ± 5.8 | 66.2 ± 13.1 |
| Hexane | 3 | 92.3 ± 6.9 | 100 ± 0 |
| Kerosene | 0.5 | 47.4 ± 7.9 | 44 ± 3.4 |
| Kerosene | 1 | 81.6 ± 1.3 | 92.9 ± 1.4 |
| Kerosene | 2 | 94.1 ± 1.8 | 93 ± 1.1 |
| Kerosene | 3 | 85.6 ± 5.8 | 76.1 ± 3.3 |
| Used frying oil | 0.5 | 55.7 ± 0.8 | 51.5 ± 1.5 |
| Used frying oil | 1 | 84.6 ± 13.1 | 65 ± 10.7 |
| Used frying oil | 2 | 89.5 ± 7.6 | 67.6 ± 21.6 |
| Used frying oil | 3 | 68.6 ± 10.6 | 51.5 ± 0 |

Values in bold: Emulsifying Index with values above 70%.

Furthermore, heat treatments caused significant effects on bioemulsifier performances as seen in Figure 4. According to our results, most of the emulsions were not stable; however, kerosene emulsions at 2 mg mL⁻¹ of EPS obtained the best results due to great stability with and without heating after both 24 and 168 h.

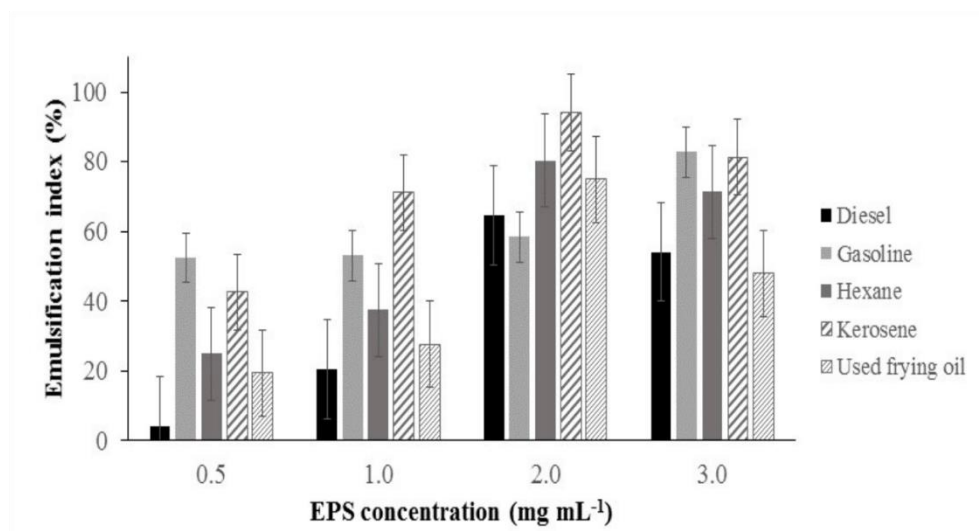


Fig. 4 Effects of heat (80°C) on stabilities of the hydrocarbon and residual oils emulsification capacities of the EPS. Different EPS concentrations were used to emulsify diesel oil, gasoline, hexane, kerosene and used frying oil.

In addition, result comparisons, as a rule, showed no combinations of EPS concentrations and different pH values were significant for diesel oil, even with an index above 50% by concentration of 2 mg mL⁻¹. Once diesel has shown the shortest emulsifying index and as it is a major soil and water pollutant, we selected it to have its emulsifying activity improved. Thus, we altered pH values using an EPS concentration of 1 mg mL⁻¹ (Table 2). Hence, the smaller the EPS concentration is to emulsify an oil, the more economic and feasible it would be considered. By these modifications, we found the best emulsion results at a pH 11 for diesel oil, reaching an index of $E_{24} > 65\%$; however, such stability was not remained after 168 h.

The results on the use of culture media can be seen in Table 3. They show a great potential of emulsifying activity for all oils; however, the greatest potential was observed for hexane, once it achieved a complete emulsion and stability.

Table 2. Emulsifying activity after 24 hours (E₂₄), 24 hours at 80°C (E_{24T}) and 168 hours (E₁₆₈) using diesel and an EPS concentration of 1mg mL⁻¹ at various pH values. Data are presented as means and standard deviation.

| pH | E ₂₄ (%) | E _{24T} (%) | E ₁₆₈ (%) |
|----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 3 | 25.99 ± 4.46 ^b | 19.73 ± 3.14 ^b | 25.29 ± 1.27 ^b |
| 5 | 16.74 ± 7.27 ^{bc} | 10.86 ± 1.89 ^c | 18.93 ± 0.17 ^{bc} |
| 9 | 13.32 ± 4.17 ^c | 13.42 ± 1.71 ^{bc} | 6.54 ± 5.79 ^c |
| 11 | 67.06 ± 1.04 ^a | 60.37 ± 0.86 ^a | 61.94 ± 2.08 ^a |

Means with the same letter are not significantly different within columns.

Table 3. Emulsifying activity using hydrocarbon and residual oils with bacterial culture media and emulsion stabilization after 24 (E₂₄) and after 168 hours (E₁₆₈). Data are presented as means and standard deviation.

| Oil | E ₂₄ (%) | E ₁₆₈ (%) |
|-----------------|---------------------|----------------------|
| Diesel | 54.2 ± 3.1 | 55.1 ± 2.7 |
| Gasoline | 71.2 ± 2.7 | 75.9 ± 3 |
| Hexane | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| Used frying oil | 87.5 ± 17.7 | 85.9 ± 20 |
| Kerosene | 75.2 ± 7.7 | 78.1 ± 5.7 |

Discussion

Several microorganisms are characterized by producing a wide range of bioemulsifiers of high or low molecular weight, such as EPS [19]. These substances have major physico-chemical properties like tolerance to extreme conditions of pH, temperature and salinity, besides of low toxicity and high biodegradability, being thus suitable for various environmental applications as enhancer of hydrocarbon biodegradation and bioemulsification, for example [1, 19].

We selected hydrocarbon and residual oils because of their impact on the environment worldwide. Furthermore, our research group has studied emulsification activity of some of these oils using EPS from rhizobia strains.

Interestingly, from the HPLC analysis, we found glucuronic acid, which is one of the components of sphingans [4, 20]. This fact may also explain the strong carboxylate peak in the EPS through the FT-IR analysis. In addition, we detected mannose, which is an usual component commonly found in other sphingans like S- 88 and S-198 [7, 21, 22]. By the above mentioned characterization, we may infer that the studied EPS show a composition similar to those belonged to sphingan family, being produced by several *Sphingomonas* strains [4, 7]. However, there are variations in the repeating structure of sphingans, which produce distinct differences in rheology [7]. Accordingly to Fialho et al. [5], sphingans share the same linear tetrasaccharide backbone structure (X-glucose-glucuronic acid-glucose-X, where X is better L-rhamnose or L-mannose) to which distinct side groups are attached.

The unexpected failure of EPS to reduce the surface tension of water can indicate that the main stabilizing effect of EPS was not due to its surface-active properties, as highlighted by [10] that obtained similar results from a viscous EPS produced by *Sphingomonas paucimobilis*.

It is clear that the EPS tested in this study produced stable emulsions at different concentrations of EPS; however, this statement relies on the oil type. Surprisingly, kerosene emulsification achieved good results. As mentioned in the prior section, the EPS concentration of 2 mg mL⁻¹ as hydrocarbon bioemulsifier showed great stability, being similar to the findings of Ashtaputre and Shah [10], who used EPS from *S. paucimobilis*. Nevertheless, the EPS from *Salipiger mucosus* A3, used as bioemulsifier for the same hydrocarbon by Llamas et al. [23], showed a lower emulsifying index than the one we found; even though the authors obtained an $E_{24} = 70\%$; it was not stable after 24 h.

Good results could be found for hexane, for two tested concentrations, similar to results found by Freitas et al. [9]. Differently, comparing our results with the bioemulsifiers studied by Moretto et al. [8] at 1 g L⁻¹ of EPS, we can note that their emulsifying indexes (E_{24}) ranged around 20%.

Even though we reached emulsifying indexes above 50% with 2 mg EPS per mL of diesel oil, other authors such as [8, 24, 25] had difficulties to emulsify the same hydrocarbon. On the other hand, Wu et al. [26] observed that sphingans Ss, produced by *Sphingomonas sanxanigenens* NX02, promoted formation of 100% emulsified layers stably with diesel when its concentration exceeded 1,000 mg L⁻¹ (0.1%, w/v) at room temperature. Aiming to achieve optimal results, changes in pH, made in our study, were valuable, observing the best result for diesel oil at a pH of 11, which was similar to results found by Moretto et al. [8].

The emulsion stability under different pH is dependent on the chemical composition, structure and the compound to be emulsified [9]. For example, the exopolysaccharide produced by *S. paucimobilis* has shown to be able to emulsify kerosene, being the emulsions stable for the pH range 2 – 10 [10]. On the other hand, the exopolysaccharide produced by *Bacillus megaterium* formed emulsions whose stability increased with pH range from 4 to 8 [25].

As mentioned in the results section, we also tested culture media to analyze its influence on biomass cell. An unanticipated finding was regarding hexane, we can hypothesize that the used *Sphingomonas* sp. strain is able to degrade this chemical; however, specific studies must be carried out to confirm such statement. Sun et al [3] reported a high chlorine-resistant capacity of a *Sphingomonas* strain isolated from a model drinking water distribution system, which can confirm the great environmental application of this bacterial group. The previously cited paper and our study are two of several studies found in literature on *Sphingomonas* biotechnological applications and evidence its importance on this subject.

As we saw here, culture media had a great potential for hexane emulsion; nevertheless, we want to highlight the great potential of EPS as hydrocarbon bioemulsifier, mainly for kerosene given its emulsifying index and stability. According to these results, we can suggest the studied EPS in biological applications as a safe alternative to chemical emulsifiers.

Conclusion

A few EPSs from *Sphingomonas* strains have been studied as emulsifiers for hydrocarbon and residual oils. The one studied here can be used as emulsifier for solutions with diesel, gasoline, hexane, kerosene and used frying oil, reaching different degrees of stability. Among our findings, kerosene emulsion had remarkable results, since it showed a good emulsifying index and emulsion stability for a long-term period, as well as thermal stability. Furthermore, our findings promoted significant contribution by showing EPS potential as a bioemulsifier agent that would enhance hydrocarbon degradation and emulsification effects in environmental biotechnology.

Acknowledgments

The authors want to thank João Carlos Campanharo for skilled scientific and technical support provided. We also thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES* (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES) for scholarship granted, the São Paulo Zoo Farm staff for technical support, and the Postgraduate Program in Agricultural Microbiology. This research was supported by funding from the *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP* (Foundation of Research Support of the São Paulo State - FAPESP) (Project number: 2013/08729-0) and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq* (National Counsel for Technological and Scientific Development - CNPq) (Project number: 478347/2013-8).

References

1. Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, et al (2008) Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination* 223:143–151. doi: 10.1016/j.desal.2007.01.198
2. Aso Y, Miyamoto Y, Harada KM, et al (2006) Engineered membrane superchannel improves bioremediation potential of dioxin-degrading bacteria. *Nat Biotechnol* 24:188–189. doi: 10.1038/nbt1181
3. Sun W, Liu W, Cui L, et al (2013) Characterization and identification of a

- chlorine-resistant bacterium, *Sphingomonas* TS001, from a model drinking water distribution system. *Sci Total Environ* 458–460:169–175. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.030
4. Seo E-J, Yoo S-H, Oh K-W, et al (2004) Isolation of an exopolysaccharide-producing bacterium, *Sphingomonas* sp. CS101, which forms an unusual type of sphingan. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1146–1148. doi: 10.1271/bbb.68.1146
 5. Fialho AM, Moreira LM, Granja AT, et al (2008) Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:889–900. doi: 10.1007/s00253-008-1496-0
 6. Sutherland IW (2001) Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int Dairy J* 11:663–674.
 7. Schmid J, Sperl N, Sieber V (2014) A comparison of genes involved in sphingan biosynthesis brought up to date. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7719–33. doi: 10.1007/s00253-014-5940-z
 8. Moretto C, Castellane TCL, Lopes EM, et al (2015) Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. *Int J Biol Macromol* 81:291–8. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.056
 9. Freitas F, Alves VD, Carvalheira M, et al (2009) Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydr Polym* 78:549–556. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.05.016
 10. Ashtaputre a a, Shah a K (1995) Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 11:219–222. doi: 10.1007/BF00704653
 11. Denner EBM, Paukner S, Kämpfer P, et al (2001) *Sphingomonas pituitosa* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium that secretes an unusual type of sphingan. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:827–841.
 12. Nampoothiri KM, Singhanian RR, Sabarinath C, Pandey A (2003) Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochem* 38:1513–1519. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00321-7
 13. Richau JA, Choquenot D, Fialho AM, et al (1997) The biosynthesis of the exopolysaccharide gellan results in the decrease of *Sphingomonas paucimobilis* tolerance to copper. *Enzyme Microb Technol* 20:510–515. doi: 10.1016/S0141-0229(96)00187-1
 14. Zhang J, Dong Y, Fan L, et al (2015) Optimization of culture medium compositions for gellan gum production by a halobacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Carbohydr Polym* 115:694–700. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.029
 15. Breedveld MW, Zevenhuizen LP, Zehnder AJ (1990) Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. *JGenMicrobiol* 136:2511–2547.
 16. Castellane TCL, Lemos EG de M (2007) Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. *Pesqui Agropecuária Bras* 42:1503–1506. doi: 10.1590/S0100-204X2007001000019
 17. Castellane TCL, Persona MR, Campanharo JC, de Macedo Lemos EG (2015) Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological

- and bioremediation applications. *Int J Biol Macromol* 74:515–22. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.007
18. Osiro D, Franco RWA, Colnago LA (2011) Spectroscopic characterization of the exopolysaccharide of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in Cu²⁺ resistance mechanism. *J Braz Chem Soc* 22:1339–1345. doi: 10.1590/S0103-50532011000700020
 19. Mnif I, Ghribi D (2015) High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. *World J Microbiol Biotechnol* 31:691–706. doi: 10.1007/s11274-015-1830-5
 20. Pollock TJ (1993) Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. *J Gen Microbiol* 139:1939–1945. doi: 10.1099/00221287-139-8-1939
 21. Jansson P-E, Kumar NS, Lindberg B (1986) Structural studies of a polysaccharide. *Carbohydr Res* 156:165–172.
 22. Chowdhury TA, Lindberg B, Lindquist U, Baird J (1987) Structural studies of an extracellular polysaccharide (S-198) elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31853. *Carbohydr Res* 161:127–132. doi: 10.1016/0008-6215(87)84011-9
 23. Llamas I, Mata JA, Tallon R, et al (2010) Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3 T, a halophilic species belonging to the Alphaproteobacteria, isolated on the Spanish Mediterranean seaboard. *Mar Drugs* 8:2240–2251. doi: 10.3390/md8082240
 24. Beltrani T, Chiavarini S, Cicero DO, et al (2015) Chemical characterization and surface properties of a new bioemulsifier produced by *Pedobacter* sp. strain MCC-Z. *Int J Biol Macromol* 72:1090–1096. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.10.025
 25. Chowdhury SR, Manna S, Saha P, et al (2011) Composition analysis and material characterization of an emulsifying extracellular polysaccharide (EPS) produced by *Bacillus megaterium* RB-05: a hydrodynamic sediment-attached isolate of freshwater origin. *J Appl Microbiol* 111:1381–1393. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05162.x
 26. Wu M, Li G, Huang H, et al (2016) The simultaneous production of sphingans Ss and poly(R-3-hydroxybutyrate) in *Sphingomonas sanxanigenens* NX02. *Int J Biol Macromol* 82:361–8. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.071

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

A pesquisa realizada com as amostras ambientais do solo da horta e da água utilizada para irrigação da fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, permitiram uma avaliação microbiológica praticamente completa do local. Uma vez que se analisou a diversidade bacteriana, perfil funcional, isolamento de bactérias e potencial biotecnológico de bioprodutos produzidos a partir de isolados.

Os estudos metagenômicos realizados, foram essenciais para fornecer uma primeira análise exploratória dos ambientes no qual nunca haviam sido analisados. Através do estudo da diversidade bacteriana pode-se perceber que as bactérias presentes em abundância tanto no solo da horta quanto na água utilizada para irrigação são comumente encontradas em áreas agrícolas.

Com relação ao solo, pode se observar uma elevada concentração de fósforo na área quando os resultados são comparados a outros estudos de fertilidade, o que em termos agronômicos é considerado normal, uma vez que há necessidade desse macro nutriente para melhorar a produtividade do local. Além do que, tanto plantas quanto micro-organismos necessitam de fosfato para atividades celulares. A comunidade bacteriana encontrada em maior abundância no solo, são, em sua maioria, responsáveis por processos de degradação da matéria orgânica e produção de enzimas extracelulares de grande interesse na agroindústria.

Na água verificou-se que não há presença de florescimento de cianobactérias ou algas. Além do que, a mesma apresenta boas condições de uso para irrigação como já comprovado em outros trabalhos do grupo de pesquisa, e também pelos dados físicos e químicos apresentados nesta tese. A comunidade bacteriana encontrada em maior abundância na água, é responsável por diversos processos, principalmente aqueles relacionados à cadeia alimentar e ciclos biogeoquímicos.

Com relação ao perfil funcional dos ambientes analisados, ficou claro que há maior influência da água utilizada para irrigação no solo do que o composto orgânico utilizado como fertilizante há mais de 10 anos no local. Composto orgânico esse, considerado atípico, uma vez que além da utilização de resíduos vegetais é utilizado no processo de compostagem carcaça de animais de grande e pequeno porte do próprio zoológico. Entretanto, a afirmação sobre a influência dos atributos funcionais

da água no solo, é feita apenas de acordo com os dados obtidos neste trabalho sem um controle negativo da área, uma vez que o local recebe esse composto orgânico há muito tempo. Análises *in silico* sobre a presença dos principais genes de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica (*eae*) ou produtora de shiga toxina (*stx*), relacionados com qualidade da água e alimentos, não foram detectados. Confirmando o mesmo resultado obtido através da técnica de PCR, realizado no trabalho de mestrado de outro membro do grupo de pesquisa (Célico, 2015).

Houve também, o isolamento de bactérias a partir de amostras de água, e com o mesmo obteve-se um total de 93 isolados bacterianos. A partir desses isolados, foram realizados testes para a produção de exopolissacarídeos (EPS). O que resultou em apenas três colônias bacterianas capazes de produzi-lo, entretanto, em meio líquido apenas a bactéria identificada como da espécie *Sphingomonas sp.* foi capaz de produzir uma boa quantidade de EPS em 48 horas. O uso do exopolissacarídeo (EPS) produzido pela espécie *Sphingomonas sp. C7* demonstrou grande potencial biotecnológico como emulsificante de óleos e hidrocarbonetos. Principalmente no que se refere à emulsificação de hexano e querosene. De acordo com pesquisas em literatura praticamente não há trabalhos envolvendo o uso EPS de diferentes espécies de *Sphingomonas* como bioemulsificantes, sendo o trabalho aqui apresentado um dos poucos que relatam essa aplicação. Apesar de o EPS estudado ter apresentado ótima capacidade emulsificante ele não foi um bom biotensioativo, o que não é um problema com os resultados obtidos. Ou seja, mesmo o EPS não sendo capaz diminuir a tensão superficial da água, como acontece em muitos agentes biosurfactantes, ele foi capaz de emulsionar muito bem os óleos testados neste estudo. Estudos futuros indicando quais outras características do EPS podem ser responsáveis pelo ótimo potencial de emulsificação desses hidrocarbonetos são fundamentais para o melhor entendimento do processo.

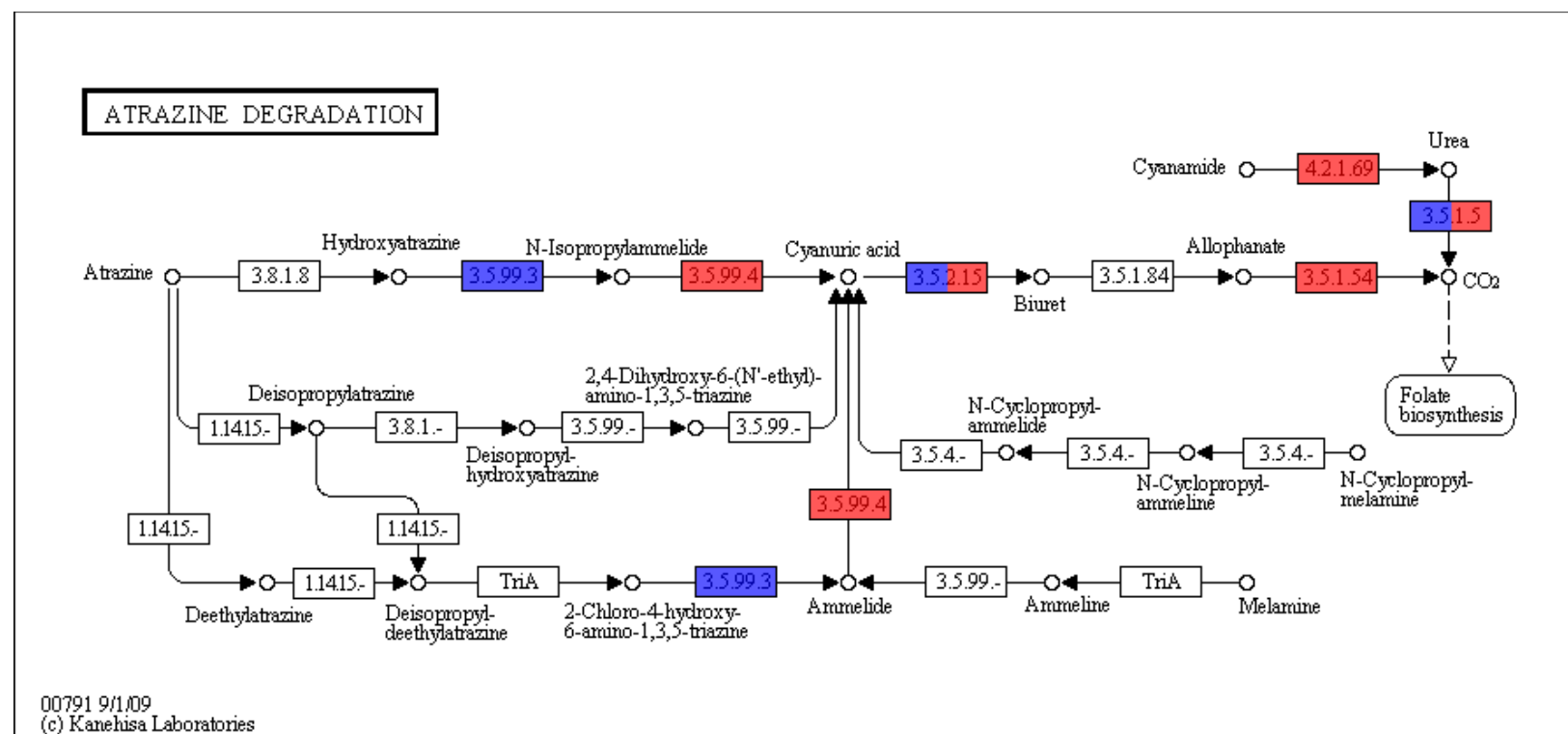
Apesar dos outros 92 isolados bacterianos não serem capazes de produzir EPS, futuros testes de produção de enzimas extracelulares podem ser feitos com os mesmos. Uma vez que, em um primeiro *screening* dos 93 isolados bacterianos, foi possível verificar 33 isolados capazes de solubilizar fosfato e 07 possivelmente capazes de produzir amilase.

Por fim, em uma análise global observando os resultados obtidos pela análise metagenômica e também do potencial biotecnológico do isolado bacteriano da água utilizada para irrigação, fica claro que os ambientes estudados neste trabalho possuem um grande potencial ainda inexplorado.

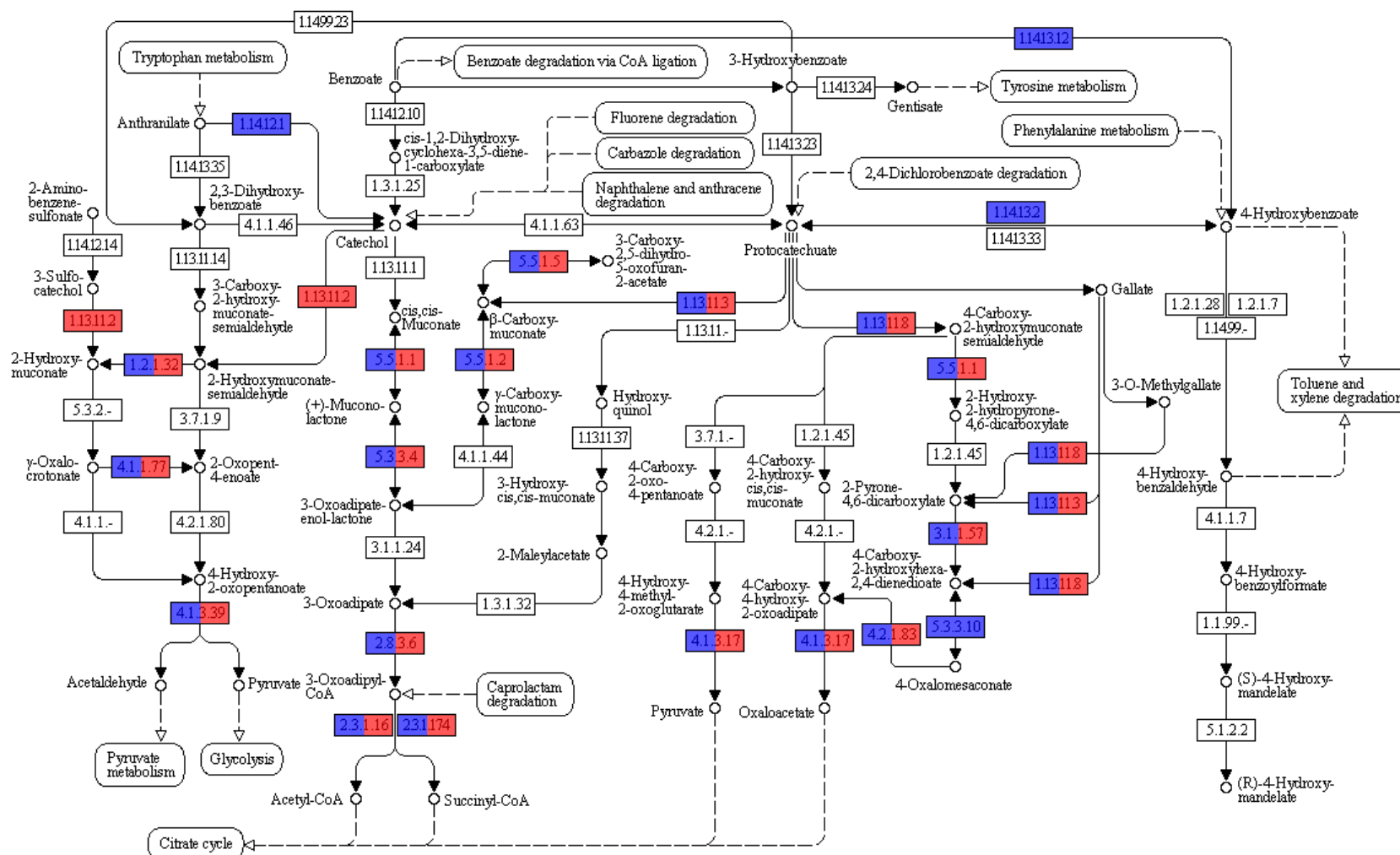
Através de observações feitas nas vias bioquímicas relacionadas ao metabolismo e degradação de xenobióticos utilizando a ferramenta Kegg Mapper do MG-RAST, percebeu-se o potencial biotecnológico que ainda pode ser extraído dos dados obtidos (observar anexos). A busca por genes relacionados ao metabolismo e degradação de xenobióticos é importante uma vez que esse tipo de composto não ocorre naturalmente, e além disso poluem o meio ambiente. Além disso, as informações acessadas são importantes, uma vez que observando os mapas de degradação, percebe-se a presença de várias enzimas relacionadas ao metabolismo de drogas e fármacos, como por exemplo, tamoxifeno, metadona, ácido valpróico e fluorouracila. A maioria dos fármacos encontrados, com as vias bioquímicas quase completas estão relacionadas a agentes anticancerígenos, ressaltando ainda mais a importância de estudos futuros a partir dos dados obtidos nesse estudo. Trabalhos futuros com foco apenas no potencial biotecnológico dos metagenomas devem ser explorados para melhor entender a dinâmica dos ambientes e também contribuir com estudos voltados para área de biotecnologia e microbiologia ambiental.

APÊNDICE

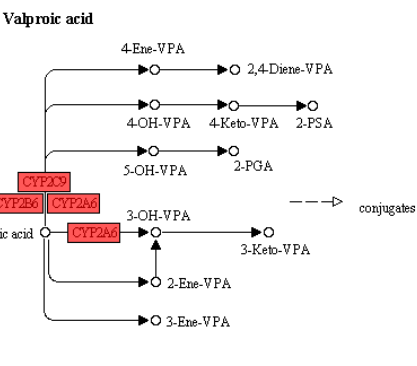
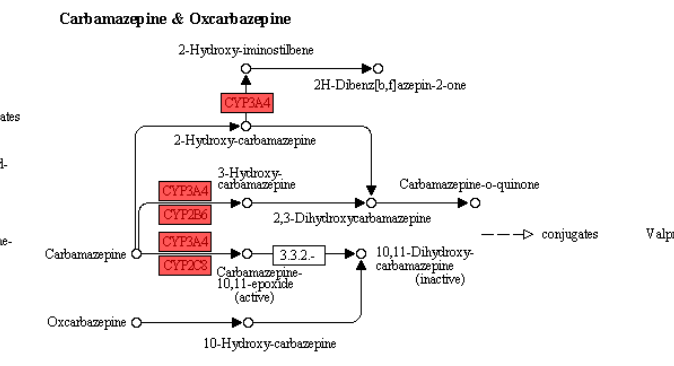
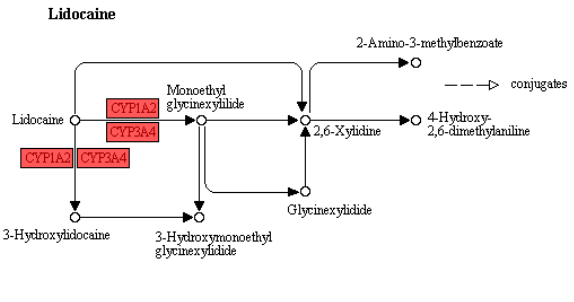
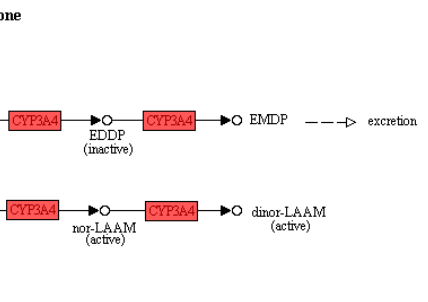
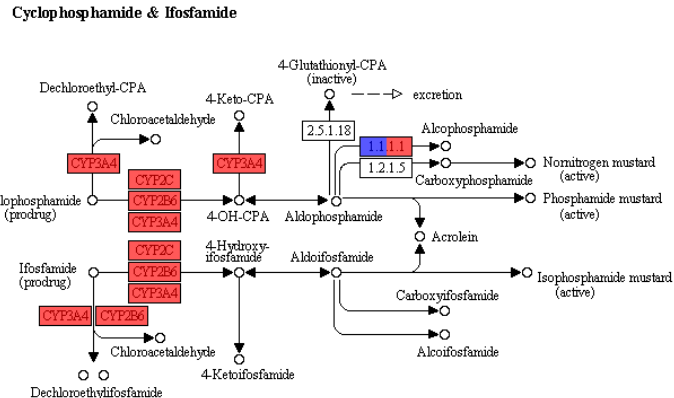
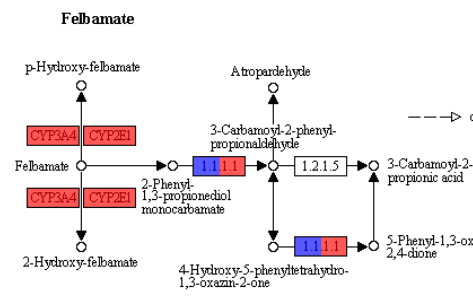
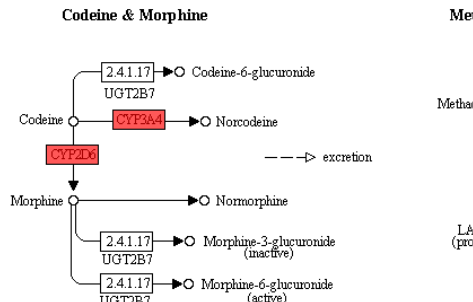
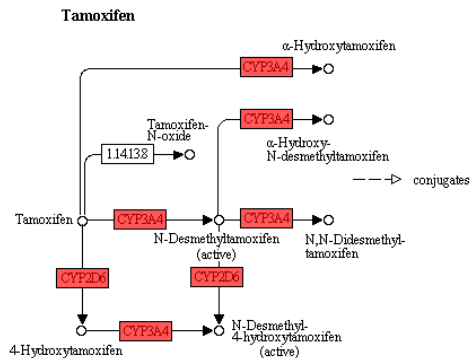
Vias de metabolismo e degradação de xenobióticos de acordo com a ferramenta Kegg Mapper apresentada para análise no MG-RAST. Os dados foram gerados utilizando-se como parâmetros: e-value máximo 1e-5, identidade mínima 80%, tamanho mínimo para alinhamento dos *reads* 20 aminoácidos. A cor azul representa as amostras de água (FW, n = 3) e vermelho solo (SVG, n = 3).



BENZOATE DEGRADATION VIA HYDROXYLATION

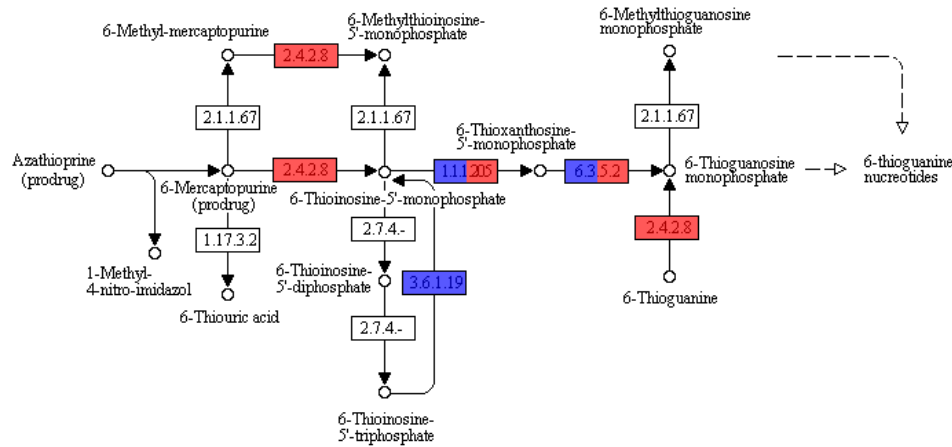


DRUG METABOLISM - CYTOCHROME P450

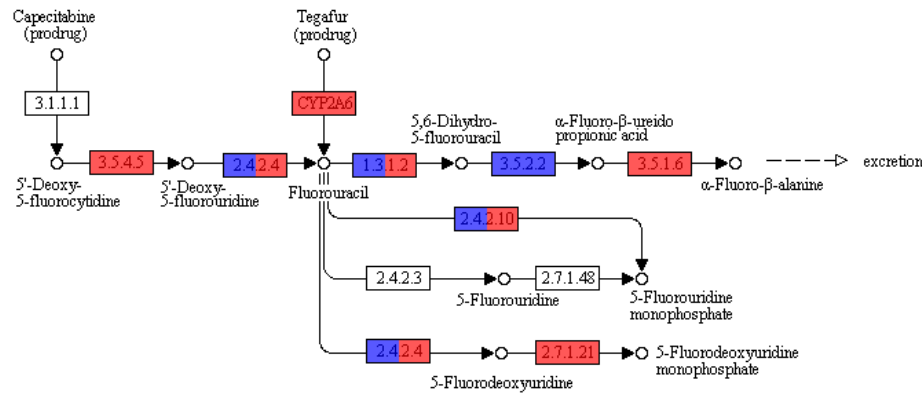


DRUG METABOLISM - OTHER ENZYMES

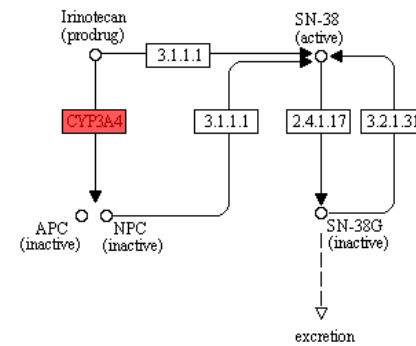
Azathioprine & 6-Mercaptopurine



Fluorouracil



Irinotecan



Isoniazid

