

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL METAGENÔMICO DE SOLO SOB CULTIVO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR COM PERSPECTIVAS NA PRODUÇÃO  
DE BIOENERGIA**

**Karla Cristina Stropa Goulart**

Bióloga

**2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL METAGENÔMICO DE SOLO SOB CULTIVO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR COM PERSPECTIVAS NA PRODUÇÃO  
DE BIOENERGIA**

**Karla Cristina Stropa Goulart**

**Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**

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

**2013**

G694p Goulart, Karla Cristina Stropa  
Perfil metagenômico de solo sob cultivo de cana-de-açúcar com perspectiva na produção de bioenergia / Karla Cristina Stropa Goulart. -- Jaboticabal, 2013  
x, 101 p. : il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013  
Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza  
Co-orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos  
Banca examinadora: Fátima Moreira, Amanda Azarias, Alessandro Varani, Janete Desidério  
Bibliografia

1. Celulase. 2. 16S rRNA. 3. Metagenoma. 4. Illumina I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461:633.61

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

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Karla Cristina Stropa Goulart** – nascida em Ribeirão Preto (SP), em 27 de abril de 1981, graduada em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá no ano de 2002. Em 2009 concluiu o curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) no Câmpus de Jaboticabal (SP), onde, no mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado. Realizou doutorado-sanduíche na Universitat de Barcelona nos anos de 2010/2011.

***“A experiência cósmica da religião é a razão mais forte e nobre para a pesquisa nas ciências naturais. O sentimento mais profundo e pungente do qual somos capazes é a experiência do místico. Só desta nasce a verdadeira ciência.”***

**Albert Einstein**

***Sem você seria tudo muito mais difícil...Mateus te amo meu amor!***

***Pai, mãe e Rafa, vocês são a essência do que me tornei!***

***Os dias são mais belos com seu sorriso Vó Lydia!***

***À vocês dedico com carinho***

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo e também por me dar o privilégio de estudar e trabalhar com a vida em suas diferentes formas;

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, chefe do LBMP (Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas) pela oportunidade, auxílios e carinho com que me recebeu e demonstrou durante as pesquisas;

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Fátima Moreira, Prof. Dr. Alessandro Varani, Dra. Amanda Azarias e Profa. Dra. Janete Desidério pelas correções e sugestões incorporadas para o enriquecimento do trabalho;

Aos membros da banca do exame de qualificação: Prof. Dr. Manoel Victor, Prof. Dr. Vitor Miranda, Profa. Dra. Lúcia Carareto e Profa. Dra. Janete Desidério pelas contribuições incorporadas no trabalho;

A todos os meus queridos amigos do LBMP, pela amizade, carinho, companheirismo, risadas, incentivo e ajuda que sempre demonstraram. Todos vocês são muito especiais!

Aos amigos do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, pela amizade e carinho de todos, e por terem cedido a linhagem de DH10B de *E. coli*;

Aos meus pais por todo apoio, força nos momentos bons e principalmente nos mais difíceis, pelas orações que certamente fizeram diferença na minha vida, e por serem o exemplo que são pra mim. Vocês foram a base essencial em todo momento..amo demais!!

Ao meu amigo, cúmplice e irmão por fazer parte da minha vida: Rafa, eu amo você e sempre estarei ao seu lado. Conte comigo!!

Em todo o tempo em que estivemos juntos você se mostrou realmente um grande companheiro. Te amo Mateus!

A todos os meus familiares e amigos que torceram por mim;

Aos meus sogros Paulo, Sônia e meu cunhado Marcelo pelo carinho e incentivo que deram;

Ao casal Ivani e Arnaldo (“chegado”) pelo incentivo, amizade e carinho mesmo de longe;

Aos Bispos Misael, Jordelino e Ovídio, muito obrigada por todo apoio, compreensão e orações que fizeram por mim em todos os momentos em que precisei. Vocês são muito especiais;

Aos amigos da Academia Malhação e Saúde, pelos momentos de muita alegria e animação que tivemos e aos amigos da Rit Academia que sempre torceram ao meu favor;

Aos funcionários do departamento de Tecnologia da Unesp;

Ao Dr. João Carlos Campanharo, pela ajuda desde a minha entrada no laboratório;

Aos amigos que fiz em Barcelona: Nacho, Noelia e esposo (Nicolas Cage), Vicen, César, Pedro, Albert, Mônica e tantos outros do laboratório de parasitologia;

A Profa. Dra. Angeles Manresa pela confiança, amizade e carinho durante minha estadia em Barcelona;

Ao meu grande mestre Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, líder, amigo, chefe, orientador, conselheiro, dentre tantas qualidades sigo seu exemplo. Muito obrigada por tudo;

À Capes pela bolsa concedida durante todo o período de desenvolvimento desta tese.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo – Perfil metagenômico de solo sob cultivo de cana-de-açúcar com perspectiva na produção de bioenergia.....	xii
Abstract – Metagenomic soil profile under cultivation of sugarcane crop with prospects in bioenergy production.....	xiii
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>1</b>
2.1. Matriz energética brasileira .....	2
2.2. Estudo ecológico e fisiológico de comunidades microbianas.....	4
2.3. A proposta de acesso à comunidade microbiana por meio da metagenômica.....	6
2.4. Potencial energético do material lignocelulósico e mecanismos para obter a energia.....	10
2.5. Identificação molecular de procariotos presentes no solo.....	13
<b>CAPÍTULO 2 – COMUNIDADE MICROBIANA EM SOLO SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>19</b>
Chaper 2 - Microbial community in soil under sugarcane cultivation .....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1. Área de amostragem e obtenção do DNA total dos micro-organismos.....	23
2. Amplificação do fragmento do gene 16S rRNA.....	26
3. Construção da biblioteca de sequencias de 16S rDNA .....	26
4. Sequenciamento Sanger dos insertos de 16S rDNA .....	27
5. Ferramentas de análise das sequencias de 16S rDNA geradas pelo sequenciamento Sanger WGA .....	28
6. Análise do metagenoma por sequenciamento Illumina® WGS.....	28
1. Obtenção do perfil funcional do solo por Ecoplate .....	30
2. Análise da resposta metabólica da comunidade microbiana no sistema Biolog.....	32

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
3.1. Propriedades do solo .....	32
3.2. Identificação da comunidade bacteriana do solo por meio do sequenciamento Sanger - WGA .....	36
3.3. Metabolismo heterotrófico médio observado nas bactérias do solo.....	43
3.4. Diversidade metabólica da comunidade ( <i>Community Metabolic Diversity – CMD</i> ).....	45
3.5. Média da resposta metabólica ( <i>Average Metabolic Response – AMR</i> ) .....	46
3.6. Cinética metabólica observada pela utilização de carbono nos diferentes substratos.....	47
3.7. Metagenoma dos micro-organismos do solo por sequenciamento de nova geração (Illumina®) .....	55
4. CONCLUSÃO .....	62
5. REFERÊNCIAS.....	63
CAPÍTULO 3 – PROSPECÇÃO DE GENES FUNCIONAIS COM PERSPECTIVAS NA PRODUÇÃO DE BIOENERGIA .....	69
Chaper 3 - Prospection of functional genes with perspectives on bioenergy production.....	69
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
1. Extração de DNA total dos micro-organismos do solo.....	73
2. Avaliação do DNA total extraído.....	74
3. Seleção e obtenção do DNA metagenômico de tamanho adequado .....	75
4. Reparo das extremidades das fitas do DNA metagenômico .....	76
5. Ligação molecular do inserto de DNA ao vetor fosmídeo.....	76
6. Empacotamento do DNA metagenômico recombinante ao fago .....	78
7. Inóculo de células EPI300–T1 <sup>R</sup> e reação de infecção.....	78
8. Extração de DNA fosmidial para validação da biblioteca metagenômica .....	79
9. Montagem dos “pools” de clones da biblioteca metagenômica e extração de DNA .....	80
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82

3.1. Palhada de cana-de-açúcar deixada sobre o solo após colheita mecanizada.....	82
3.2. Prospecção de celulasas no metagenoma dos micro-organismos do solo.....	84
3.3. Padrão de qualidade do DNA metagenômico e validação da biblioteca metagenômica .....	86
3.4. Perfil da comunidade microbiana do solo por sequenciamento Illumina® (WGS).....	88
3.5. Perfil da comunidade microbiana do solo por sequenciamento Sanger.....	91
4. CONCLUSÃO.....	93
5. REFERÊNCIAS.....	94

## LISTA DE FIGURAS

	pg.
Figura 01: Esquema representativo das etapas principais de construção de uma biblioteca metagenômica oriunda de amostra de solo.....	08
Figura 02: Ilustração simplificada da estrutura do material lignocelulósico.....	11
Figura 03: Regiões hipervariáveis no gene 16S baseado em modelo de <i>E. coli</i> .....	15
Figura 04: Diagrama ilustrativo das etapas experimentais.....	23
Figura 05: Imagem de satélite da região de Pitangueiras – SP.....	24
Figura 06: Área de amostragem do campo pós colheita mecanizada de cana-de-açúcar sobre palhada.....	25
Figura 07: Ilustração do mapa do vetor pJET1.2.....	27
Figura 08: Classificação das OTUs representativas da comunidade microbiana do solo do total de 39 sequencias .....	37
Figura 09: Fenograma das sequencias de bactérias do solo sob cultivo de cana-de-açúcar.....	40
Figura 10: Curva de rarefação indicando o número de OTUs da biblioteca de clones do 16S rDNA oriundas da microbiota bacteriana presente no solo sob cultivo de cana-de-açúcar. As OTUs são ilustradas por 3, 10 e 20% de distância genética no sentido F.....	42
Figura 11: Ilustração do desenvolvimento de cor pela redução do tetrazólio na placa Biolog Ecoplate.....	44
Figura 12: Cinética do metabolismo dos micro-organismos por fontes de carbono em Biolog Ecoplate evidenciando a riqueza funcional da comunidade microbiana (“average metabolic response” – AMR), durante redução de tetrazólio em relação ao tempo de incubação da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.....	45
Figura 13: Média da resposta metabólica em relação ao tempo de incubação em função da média do desenvolvimento de cor na microplaca Biolog Ecoplate da análise do perfil fisiológico da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.....	47

Figura 14: Somatória das médias de densidade dos grupos carbônicos degradados pela microbiota em relação ao tempo de incubação da placa.....	48
Figura 15: Carboidratos prontamente degradados em função da densidade ótica em relação ao tempo de incubação da placa Biolog Ecoplate.....	49
Figura 16: Estrutura química da celobiose, composta por duas moléculas de glicose unidas por ligação $\beta(1\rightarrow4)$ e resulta da hidrólise parcial da celulose.....	50
Figura 17: Ácidos carboxílicos de maior atividade de degradação em função da densidade ótica em relação ao tempo de incubação da placa Biolog Ecoplate.....	52
Figura 18: Estrutura química do ácido málico.....	52
Figura 19: Aminoácidos de maior atividade de degradação em função da densidade ótica em relação ao tempo de incubação da placa Biolog Ecoplate.....	53
Figura 20: Estrutura química do aminoácido fenilalanina.....	54
Figura 21: Sequencias do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, sendo que 120 mil sequencias foram analisadas e confrontadas com sequencias de micro-organismos descritos nos bancos de dados.....	57
Figura 22: Número de sequencias do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequencias dos Filos descritos nas bases de dados.....	58
Figura 23: Número de sequencias do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequencias das Classes descritas nas bases de dados.....	59
Figura 24: Número de sequencias do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequencias das Ordens descritas nas bases de dados.....	59
Figura 25: Número de sequencias do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequencias das Famílias descritas nas bases de dados.....	60
Figura 26: Número de sequencias do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequencias dos Gêneros descritos nas bases de dados.....	60

Figura 27: Número de sequencias do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequencias de Espécies descritas nas bases de dados.....	61
Figura 28: Fluxograma do trabalho desenvolvido.....	73
Figura 29: Mapa do vetor pCCFOS™ da Epicentre Biotechnologies.....	77
Figura 30: Estrutura da carboximetilcelulose (CMC).....	84
Figura 31: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,6% do DNA metagenômico do solo. A primeira canaleta corresponde ao marcador molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) e nas canaletas seguintes 1, 2 e 3 representam os DNAs extraídos.....	86
Figura 32: Restrição de DNA fosmidial com a enzima <i>Bam</i> HI de alguns clones da biblioteca metagenômica de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.....	87
Figura 33: Categorias encontradas na amostra metagenômica de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.....	88

## LISTA DE TABELAS

	pg.
Tabela 01: Grupos de carbono presentes nas placas Biolog Ecoplate.....	31
Tabela 02: Propriedades químicas do solo sob cultivo de cana-de-açúcar pós-colheita mecanizada na área de 25 m <sup>2</sup> do campo.....	33
Tabela 03: Índices de diversidade e estimadores de riqueza da comunidade microbiana do solo.....	42
Tabela 04: Propriedades da palhada de cana-de-açúcar deixada sobre o solo após a colheita mecanizada.....	82
Tabela 05: Classificação das OTUs de 120 mil sequencias de DNA metagenômico de solo sob cultivo de cana-de-açúcar pelo WebCarma em confronto com os bancos de dados mundiais.....	97, 98, 99 e 100
Tabela 06: Categorias de 120 mil sequencias de DNA metagenômico de solo sob cultivo de cana-de-açúcar pelo WebCarma em confronto com os bancos de dados mundiais.....	101

**LISTA DE ABREVIATURAS**

WGS: whole genome sequencing

WGA: whole genome amplification

CLPP: community level physiological profiling

DNA: ácido desoxirribonucléico

PCR: polymerase chain reaction

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio

dntp: desoxirribonucleotídeos fosfatados

pH: potencial de hidrogênio

K: potássio

Ca: cálcio

Cu: cobre

Fe: ferro

M.O: matéria orgânica

OTU: Operational taxonomic units

CMC: carboximetilcelulose



## PERFIL METAGENÔMICO DE SOLO SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM PERSPECTIVAS NA PRODUÇÃO DE BIOENERGIA

**RESUMO** – A comunidade microbiana presente no solo sob ação antropogênica representa um rico ambiente a ser explorado. O potencial enzimático engloba genes como as celulases que atuam na desconstrução do arcabouço celulósico da parede celular da cana-de-açúcar disponibilizando glicose podendo ser aplicada na produção de etanol de segunda geração. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial funcional e biotecnológico da comunidade microbiana por meio da metagenômica WGS (*whole genome sequencing*) e caracterizar os principais grupos presentes no solo através da WGA (*whole genome amplification*). O domínio de maior destaque foram as *Proteobacteria*, apontada como atuante principal dos diversos processos ecológicos. Construímos uma árvore de distância genética dos principais gêneros de bactérias, o que possibilitou estimar a relação dos grupos procarióticos obtidos. A biblioteca metagenômica construída possui pouco mais de 17 mil clones, sendo identificados 3 clones com atividade hidrolítica em meio contendo carboximetilcelulose como única fonte de carbono. A análise da estrutura química da palhada confirmou a importância da mesma na permanência do solo, contendo alto teor de carbono, influenciando do sequestro de carbono pela microbiota do solo. A análise por meio da plataforma Illumina possibilitou identificar diversas categorias funcionais presentes nas sequências de DNA metagenômico dos micro-organismos do solo sob cultivo de cana-de-açúcar. Foram identificados diversos genes dentre eles várias ATP binding, hidrolases, oxidoredutases e outros tabelados no material suplementar deste trabalho. Os resultados foram promissores e abrem novas perspectivas para ampliar os estudos na elucidação dos grupos funcionais identificados.

**Palavras-chave:** celulase, 16S rRNA, metagenoma, Illumina

## **METAGENOMIC SOIL PROFILE UNDER CULTIVATION OF SUGARCANE CROP WITH PROSPECTS IN BIOENERGY PRODUCTION**

**ABSTRACT** - The microbial community in the soil under anthropogenic represents a rich environment to be explored. The enzymatic potential involves genes that act as cellulases in deconstructing the framework cellulosic cell wall of sugar cane delivering glucose can be applied in the production of second generation ethanol. The aim of this study was to evaluate the functional and biotechnological potential of the microbial community by metagenomic WGS (whole genome sequencing) and characterize the main groups in the soil through the WGA (whole genome amplification). The domain most prominent were the Proteobacteria, appointed as acting chief of several ecological processes. Build a tree of genetic distance of the main genera of bacteria, allowing to estimate the relationship of prokaryotic groups obtained. The metagenomic library constructed have little over 17 thousand clones, three clones were identified with hydrolytic activity in media containing carboxymethyl cellulose as the sole carbon source. The analysis of the chemical structure of stubble confirmed the importance of staying in the same soil, containing high-carbon, influencing carbon sequestration by soil microbes. The analysis by Illumina platform highlighted several functional categories present in the metagenomic DNA sequences of micro-organisms in the soil under cultivation of cane sugar. We identified several genes among them several ATP binding, hydrolases, oxidoreductases and other supplementary material tabulated in this work. The results are promising and open new perspectives for larger studies to elucidate the functional groups identified.

**Keywords:** microbial diversity, 16S rRNA, metagenome, DNA sequencing, Illumina.

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil atualmente é o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) no mundo e se destaca na produção de açúcar e etanol conquistando cada vez mais o mercado externo com o uso do biocombustível.

A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) realizou entre os dias 03 e 16 de março deste ano (2013), o quarto levantamento da safra 2012/2013, e, conjuntamente, o primeiro levantamento da safra 2013/2014 de cana-de-açúcar. Para a temporada de 2013/2014, a cultura da cana-de-açúcar continua em expansão, sendo previsto que o Brasil tenha um acréscimo na área de cerca de 408 mil hectares, equivalendo a 4,8 em relação à safra 2012/2013. O acréscimo é reflexo do aumento de área da Região Centro-Sul. A área (em mil ha) destinada ao plantio de cana-de-açúcar na safra de 2013/2014 é de 8.893,000 com produtividade (em kg/ha) de 73.520 e produção (em mil t) de 653.809,0, ao quais 331.657,1 são destinados à produção de açúcar e 322.151,9 à produção de etanol (CONAB, 2013).

Nosso país está em uma posição privilegiada em relação à produção de etanol, pelas vantagens tecnológicas, possibilitando a liderança na agricultura de energia e mercado de biocombustíveis sem ampliar a área desmatada ou reduzir a área destinada à produção de alimentos. A fim de evitar que ocorra competição pelo uso da terra para a produção de biocombustíveis e de alimentos, é preciso investir no desenvolvimento de tecnologias de biocombustível para produção do etanol. A combinação das rotas de primeira e segunda gerações na produção de etanol de cana-de-açúcar permitirá obter maior quantidade de combustível sem aumentar o volume de matéria-prima cultivada nem a área plantada (EMBRAPA, 2011).

O solo representa uma das maiores fontes microbianas em todo o planeta, sendo essa biodiversidade oculta e representativa de um grande recurso inexplorado para obtenção de produtos naturais com potencial para aplicação na agricultura e outras áreas biotecnológicas (SLEATOR et al., 2008). Os microbiologistas apontam dificuldades em cultivar grande parte da microbiota presente no solo, o que de fato

vem ao encontro de relatos de que apenas 0,1 a 1,0% da microbiota do solo são cultiváveis por meio de métodos padrões (TORSVIK et al., 2002). Diante disso, a metagenômica é considerada uma ferramenta poderosa para explorar o ambiente microbiano em suas potencialidades genéticas e metabólicas (HANDELSMAN, 2004; DANIEL, 2005; SILVEIRA et al., 2006; FERRER et al., 2009; STEELE et al., 2009; SIMON e DANIEL, 2010).

O objetivo do presente estudo foi identificar micro-organismos presentes no solo sob cultivo de cana-de-açúcar, avaliar a habilidade de degradação e obtenção de energia por meio de substratos carbônicos, e explorar categorias funcionais relacionadas aos ciclos biogeoquímicos e vias metabólicas de potencial celulolítico, por meio da abordagem metagenômica WGA e WGS.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Matriz energética brasileira**

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) da família Poaceae foi introduzida no Brasil no período colonial e se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo como também se destaca na produção de açúcar e etanol e conquista cada vez mais o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. A área (em mil ha) destinada ao plantio de cana-de-açúcar na safra de 2013/2014 é de 8.893,000 com produtividade (em kg/ha) de 73.520 e produção (em mil t) de 653.809,0, ao quais 331.657,1 são destinados à produção de açúcar e 322.151,9 à produção de etanol (CONAB, 2013).

Em relação ao etanol, segundo a CONAB, houve uma redução drástica das exportações nesta safra, em torno de 1,5 bilhões de litros em comparação a safra anterior quando foram exportados cerca de 4,9 bilhões de litros. Isto se deve ao fato de que há uma latente demanda pelo etanol no mercado interno em função do aumento da frota de veículos tipo “flex” que respondem por cerca de 90% das vendas de veículos leves. A produção de etanol fechou em 23,64 bilhões de litros na

safras de 2012/2013 e é estimada em 25,77 bilhões de litros para 2013/2014, um incremento de 2,13 bilhões de litros, alta de 8,99.

Tendo em vista a demanda de produtos gerados pelo cultivo de cana-de-açúcar, é justificado o aumento da área a ser utilizada para o plantio desta cultura como indicado pelos órgãos de levantamentos estatísticos. A área utilizada ao cultivo de cana-de-açúcar no Brasil, em grande parte sofre a prática da queima da palha para facilitar e diminuir custos de colheita manual. Contudo, apesar destes benefícios aos produtores, a prática de queima desta cultura pode interferir negativamente em alguns ecossistemas podendo gerar alta poluição atmosférica. Os gases produzidos durante a queima, de acordo com o "*Intergovernmental Panel on Climate Change*" (IPCC), além do CO<sub>2</sub>, aparecem também: N<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub>, CO e CH<sub>4</sub> que agravam ainda mais o efeito estufa e o aquecimento global. Diante desta problemática, está previsto um calendário para a redução gradual de queimada da cana-de-açúcar até 2017, sendo proibido o plantio da cultura no Pantanal, na Bacia do Alto Paraguai (BAP) e em áreas com cobertura vegetal nativa (CONAB, 2013).

O ciclo biogeoquímico do carbono (C) no solo é equilibrado quando não há queima, pois o C que seria emitido permanece na palhada e no solo, que por decomposição desta matéria orgânica pela microbiota, parte do C é emitido à atmosfera de maneira gradual permitindo um estoque elevado deste composto no solo. O Brasil vem ganhando destaque no mundo em termos de redução de gases de efeito estufa com o plano apresentado na conferência de Copenhague em 2009, propondo a redução em 39% das emissões de CO<sub>2</sub> até 2020, empregando recursos de R\$ 282,2 bilhões. À agricultura seria destinado 1/5 deste valor e o restante para construção de hidrelétricas. Contudo, o governador de São Paulo arguiu em defesa do potencial que o etanol brasileiro apresenta como fonte de energia limpa, resultando na redução dos efeitos do aquecimento global. Também destacou a pesquisa brasileira como atuante em trabalhos científicos de ação ambiental, citando o investimento da FAPESP em programas de biodiversidade, bioenergia e mudanças climáticas globais (MARQUES, 2010).

O Brasil está em uma posição privilegiada em relação à produção de etanol, por ter vantagens tecnológicas, possibilitando a liderança na agricultura de energia e mercado de biocombustíveis sem ampliar a área desmatada ou reduzir a área

destinada à produção de alimentos. Diante disso, tecnologias para melhorar o desempenho da produção no setor ganham importância fundamental no país, tecnologias estas que podem advir das seguintes maneiras: por aperfeiçoamento das técnicas para produção de etanol de primeira geração (a partir da sacarose); ou pelo desenvolvimento científico e tecnológico de produção do etanol de segunda geração (a partir da celulose e hemicelulose). A fim de evitar que ocorra competição pelo uso da terra para a produção de biocombustíveis e de alimentos, é preciso investir no desenvolvimento de tecnologias de biocombustível para produção do etanol. A estimativa é de que o aproveitamento do bagaço e parte das palhas e pontas da cana-de-açúcar eleve a produção de álcool em 30 a 40%, para uma mesma área plantada. A combinação das rotas de primeira e segunda gerações na produção de etanol de cana-de-açúcar permitirá obter maior quantidade de combustível sem aumentar o volume de matéria-prima cultivada nem a área plantada (EMBRAPA, 2011).

## **2.2. Estudo ecológico e fisiológico de comunidades microbianas**

A biodiversidade do solo, considerado um dos habitats menos estudados, começou a ser interessante devido sua complexidade e pelo fator crucial na regulação e no funcionamento dos processos ecológicos. Micro-organismos presentes no solo são capazes de quebrar moléculas orgânicas complexas e liberar nutrientes inorgânicos os quais podem ser utilizados pelas plantas. A proporção de matéria orgânica morta entra em declínio dependendo da biomassa e atividade metabólica dos micro-organismos. Estes parâmetros são controlados por numerosos fatores naturais como temperatura, umidade, composição da matéria orgânica, tipo de vegetação e propriedades do solo (STEFANOWICZ, 2006). Pesquisas desenvolvidas apontando micro-organismos como sendo bioindicadores do solo, mostram que características como abundância e atividade bioquímica, fornecem respostas rápidas às mudanças ambientais, e com isso, apresentam alto potencial na avaliação de qualidade do solo (SIX et al., 2006).

A possibilidade de mensurar a atividade fisiológica de micro-organismos permite o estudo de diferentes características de comunidades microbianas. O

principal é compreender o papel da comunidade microbiana em diferentes ambientes, isso é essencial se ter conhecimento da função da comunidade e a diversidade funcional. A função da comunidade microbiana implica a atividade catabólica atual expressada. Em contrapartida, a diversidade funcional indica a atividade potencial, como por exemplo, a capacidade de uma comunidade para adaptar seu metabolismo (catabolismo) e/ou a composição relativa e tamanho da população constituente variando condições abióticas (microclima e adição de substratos). Frente a estes interesses, Garland e Mills (1991) introduziram o uso comercial de microplacas Biolog como um sistema de identificação de bactérias a fim de acessar a diversidade funcional destes micro-organismos oriundos de amostras ambientais, baseado na utilização de padrões de fontes de carbono. A técnica atraiu muita atenção, tendo sido publicado mais de 120 artigos científicos, talvez porque os dados eram facilmente gerados e relativamente de fácil interpretação.

As microplacas Biolog Ecoplate são compostas por fontes de C e fornecem o nível do perfil fisiológico da comunidade microbiana (*Community Level Physiological Profiling* - CLPP). O teste fundamenta-se na alteração da coloração dos tecidos vivos em presença de solução de sal de tetrazólio, devido à atividade das enzimas desidrogenases durante a respiração. Com isso ocorre a liberação de íons hidrogênios com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, incolor e solúvel, reage com tecidos vivos formando uma substância de cor avermelhada e insolúvel denominada formazan (DELOUCHE et al., 1976). O corante produzido tem uma variedade de cores, azul escuro, vermelho, alaranjado, o que depende da origem do sal. Tecidos mortos ou muito deteriorados apresentam-se sem coloração. O padrão de coloração pode ser um indicativo de células viáveis e não viáveis, e das viáveis, as que apresentam maior atividade bioquímica.

Inicialmente foram desenvolvidas placas para bactérias gram-negativas (GN), as quais possuem adição de antibiótico específico para a eliminação seletiva de gram-positivas e fungos, e posteriormente foram desenvolvidas para as gram-positivas (GP). A placa EcoPlate agora produzida, está adaptada para aplicações ecológicas e compreendem um conjunto de 31 substratos ambientais de C (em triplicata) dos quais ao menos 9 são considerados constituintes de exudados de

raízes de plantas (CAMPBELL et al., 1997). Os fungos não contribuem com o perfil de desenvolvimento de cor pela comunidade microbiana nas placas, pois são incapazes de incorporar o corante tetrazolium.

As placas Biolog FF, específicas para fungos, contêm alguns substratos de C diferentes em relação à Ecoplate e somados ao corante tetrazolium modificado desenvolvido para ser metabolizado por fungos. Para prevenir interferências de turbidez ou desenvolvimento de cor por bactérias, uma combinação apropriada de antibióticos ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  de rifamicina,  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de estreptomicina), os quais não afetam o desenvolvimento dos fungos, deve ser incluída.

A diversidade metabólica é consequência da diversidade genética, dos efeitos ambientais na expressão gênica, e das interações ecológicas entre as diferentes populações (ZAK, 1994). Devido aos problemas com o uso destas placas, este método é provavelmente insuficiente para caracterizar comunidades microbianas do solo. Por esta razão, esta técnica é mais adequada para pesquisas comparativas, por exemplo, comparação de diversidade funcional de uma comunidade microbiana de solo contaminado e outra de solo não contaminado. Estas placas são usadas para indicar o estado fisiológico da comunidade microbiana ambiental (PAPATHEODOROU et al., 2008).

Apesar destas limitações, o método Biolog pode revelar diferenças consideráveis nos padrões de utilização de substratos de C pelas comunidades microbianas (GRAHAM e HAYNES, 2005). A melhor definição, apesar de pouca literatura atual, é a descrita no artigo de Stefanowicz (2006) que descreve que o método Biolog investiga a diversidade funcional (ZAK et al., 1994) ou potencial metabólico (SCHUTTER e DICK, 2001) de parte de uma comunidade na qual é capaz de ser metabolicamente ativa e crescer nas condições da placa.

### **2.3. A proposta de acesso à comunidade microbiana por meio da metagenômica**

Em 1998 o termo metagenômica foi proposto pela primeira vez por Handelsman e colaboradores, equipe que descreveu o termo como sendo a análise



de sequências e também por investigação funcional de genomas em uma amostra ambiental. Em suma, metagenoma é o conjunto de genomas. Ainda que Handelsman e colaboradores tenham definido um termo para esta questão de genomas conjuntos, dois anos antes Stein e colaboradores foram os primeiros a publicarem algo na área chamando de bibliotecas de DNA ambiental. Em suas pesquisas, os autores estudaram fragmentos de DNA em torno de 40 kb de uma arqueia marinha com intuito de elucidar o micro-organismo presente em amostras ambientais. Para isto, aplicaram a técnica de PCR com iniciadores para a região 16S rRNA.

Somente após quatro anos do trabalho de Stein e colaboradores, foi publicado o primeiro artigo com a aplicação metagenômica em solo (RONDON et al., 2000), isto devido a dificuldades em se trabalhar com amostras complexas e os contaminantes que, em geral, inibem reações enzimáticas. Rondon e colaboradores são considerados por muitos pesquisadores como os primeiros no campo da era metagenômica, fato evidenciado na riqueza de análises realizadas pelo grupo. Os autores exploraram aspectos filogenéticos, funcionais de diversas enzimas de interesse biotecnológico e vias metabólicas produtoras de moléculas.

Houve certa revolução no que se refere à química biológica e uma mudança de paradigma no campo da biotecnologia com o advento da metagenômica. A metodologia emprega técnicas moleculares clássicas (purificação e clonagem de DNA) e microbiológicas (perfil fisiológico), que juntas são ferramentas poderosas para trazer a luz o desconhecido e tornar possível a prospecção biotecnológica (ROLF, 2005).

A fim de obter cópias de fragmentos de DNA oriundos de amostras ambientais, a metagenômica emprega em princípio a construção de uma biblioteca. Os processos para construir uma biblioteca metagenômica incluem: obtenção de DNA dos micro-organismos do solo; ligação em vetor específico; transformação em célula competente e cultivo dos clones (Figura 01).

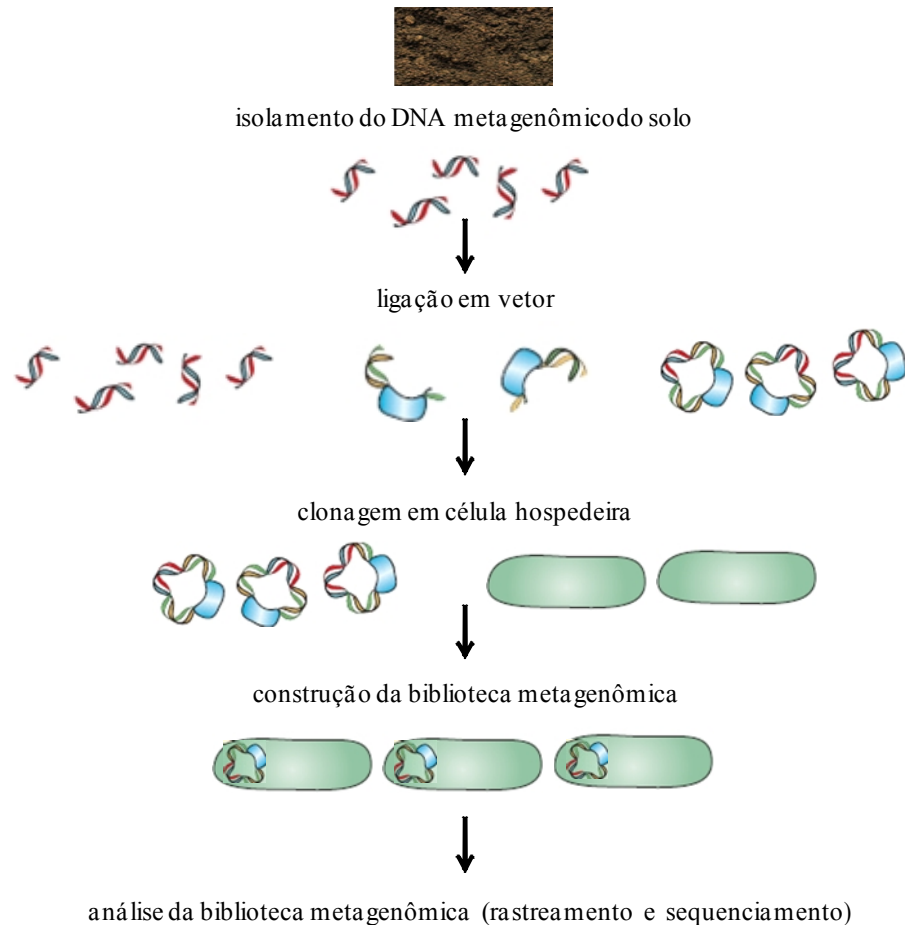


Figura 01: Esquema representativo das etapas principais de construção de uma biblioteca metagenômica oriunda de amostra de solo (GOULART et al., 2013).

A aplicação metagenômica para explorar amostras ambientais tem sido considerada como a mais acurada técnica para desvendar um nicho ecológico (von MERING et al., 2007). O solo representa a maior fonte microbiana em todo o planeta, sendo essa biodiversidade oculta e representativa de um grande recurso inexplorado para obtenção de produtos naturais com potencial para aplicação na agricultura e outras áreas biotecnológicas (SLEATOR et al., 2008). Sendo considerado como um ambiente de impressionante riqueza, ainda muitos microorganismos não foram caracterizados, o que aumenta o interesse em explorar com afinco este ambiente.

O número total de células procarióticas na Terra está estimado em aproximadamente  $4-6 \times 10^{30}$  sendo a maioria ainda não caracterizada (SLEATOR et al., 2008). Um grama de solo de floresta contém cerca de  $4 \times 10^7$  células

procarióticas, ao passo que, um grama de solo cultivado e pastagens contêm cerca de  $2 \times 10^9$ . Com base na reassociação cinética de DNA isolado de várias amostras de solo, o número de distintos genomas procarióticos tem sido estimado na ordem de 2.000 a 18.000 genomas por grama de solo. Estes números podem estar subestimados, pois os genomas representam espécies raras e ocultas que podem estar sendo excluídas destas análises. Entretanto, a diversidade procariótica presente, é somente um grama de solo, podendo exceder o conhecido catálogo de taxonomia do NCBI. Devido à imensa heterogeneidade física, química e biológica, o solo é considerado o ambiente microbiano mais diverso no mundo (ROLF, 2005).

Os microbiologistas apontam dificuldades em cultivar grande parte da microbiota presente no solo, o que de fato ao encontro de relatos de que apenas 0,1 a 1,0% da microbiota do solo são cultiváveis por meio de métodos padrões (TORSVIK et al., 2002). Diante disso, a metagenômica é considerada uma ferramenta poderosa para explorar o ambiente microbiano em suas potencialidades genéticas e metabólicas (HANDELSMAN, 2004; DANIEL, 2005; SILVEIRA et al., 2006; FERRER et al., 2009; STEELE et al., 2009; SIMON e DANIEL, 2010).

A análise da biblioteca metagenômica pode ser feita abordando duas metodologias: funcional e sequencial (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003). A investigação por meio da função identifica clones que expressam enzimas ou uma via metabólica desejada (JEONG et al., 2009) sendo o fenótipo identificado em meios de cultivo com substrato específico. A abordagem por meio de sequencia é feita com a aplicação de sondas de hibridização desenhadas com base em regiões conservadas do DNA, ou por PCR, possibilitando encontrar genes de interesse. Por este método é utilizado também o sequenciamento das extremidades dos insertos de DNA recombinante ou sequenciamento total dos DNAs. A identificação das sequencias metagenômicas é feita por comparação em banco de dados mundiais (SCHLÜTER et al., 2008; MORIMOTO e FUJII, 2009).

As descrições de exploração parecem simples e práticas, contudo possuem em ambas as abordagens, vantagens e desvantagens. A aplicação funcional identifica com rapidez clones que expressam enzimas que poderão possivelmente servir como produto biotecnológico, contudo, a expressão em organismos heterólogos pode não ter êxito na maioria das enzimas. A identificação por

sequências não é limitado ao que se refere à expressão heteróloga e possui maior amplitude em termos de diversidade genética. Contudo, obter a identidade seqüencial de um gene não indica êxito na expressão e também não esclarece que a proteína codificada possui igual função às relatadas nos bancos de dados (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003).

O intuito de construir uma biblioteca metagenômica é de obter grande quantidade de clones oriundos da microbiota de solo sobre cultivo de cana-de-açúcar, para possibilitar a identificação de genes que codifiquem enzimas envolvidas em vias metabólicas para produção de etanol de segunda geração e categorizar micro-organismos presentes.

#### **2.4. Potencial energético do material lignocelulósico e mecanismos para obter a energia**

O bagaço da cana-de-açúcar é um subproduto que em relação à produção total corresponde a 1/3, produto este que em conjunto com a palhada se tornam responsáveis por 2/3 de energia que deixa de ser aproveitada pela planta. As pesquisas avançam no que se refere ao melhoramento genético da cana-de-açúcar e ao estudo de vias metabólicas, o que pode render plantas de porte maior com melhor rigidez da parede celular e alto rendimento na produção de etanol. A aplicação da engenharia genética visa maior volume de bagaço ao final do processo de produção de etanol e açúcar, por fermentação da sacarose pelas leveduras (REYNOL, 2010).

No procedimento de obtenção de etanol, na última moagem da cana-de-açúcar, o bagaço resulta em um pó formado de partículas de diferentes tamanhos. A porção com maior percentual de lignina corresponde à parte mais seca e rígida, sendo, portanto, de difícil degradação. Em contrapartida, a parte rica em celulose é a porção mais úmida e maleável do composto, advinda do interior dos colmos da cana-de-açúcar que indica a possibilidade de um melhor aproveitamento do material (MARQUES, 2009).

O bagaço e a palhada são compostos por celulose (6C), hemicelulose (5C), pectinas (homogalacturonano e ramnogalacturonano) e lignina que é um composto

fenólico aromático que tem função impermeabilizante e dá resistência e rigidez contra fatores impactantes aos tecidos vegetais. A lignina é encontrada associada à parede celular vegetal, o que confere maior recalcitrância à quebra dos compostos glicosídicos e conseqüentemente obtenção de maior rendimento ao produto final da fermentação. Diante disso, para desestruturar a organização do complexo lignocelulósico (Figura 02), a biomassa é submetida a um pré-tratamento, o que obviamente tem a lignina como maior barreira sendo sua quebra responsável pela liberação de substâncias inibidoras do processo fermentativo (MENEZES et al., 2009).

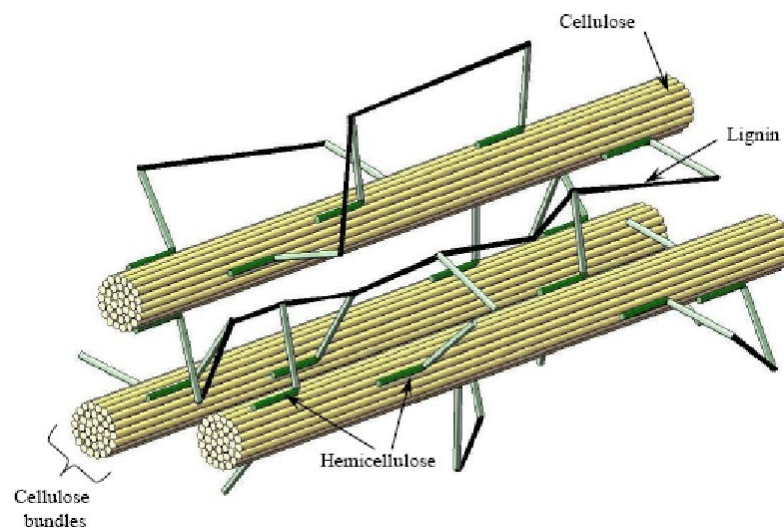


Figura 02: Ilustração simplificada da estrutura do material lignocelulósico

A celulose é composta de cadeias lineares de resíduos glicosídicos de ligação  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), que possui de 2000 a 20.000 unidade de glicose, sendo que 36 destas moléculas lineares podem constituir a estrutura cristalina que é mantida por pontes de hidrogênio denominadas protofibrilas. As protofibrilas quando em unidades mais grossas formam as microfibrilas, que em conjunto formam as fibras de celulose (LYND et al., 2002). Este complexo celulósico possui a energia da glicose contida com potencial exploratório na produção de etanol de segunda geração.

As hemiceluloses são xilanos, mananos, glicomananos e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-glicanos e alguns polissacarídeos como galactanos, arabinanos e arabinoglicanos se

assemelhando a moléculas de pectinas. Estes são polissacarídeos com alta concentração de ácido galacturônico, ácido glicurônico e em alguns casos ramnosil (SCHELLER e ULVSKOV, 2010).

As ligninas são compostos aromáticos derivados de alcoóis como hidroxicinamílicos, ou monolignóis, os quais se ligam aos glicuronoarabinosanos da parede celular vegetal formando complexos polissacarídicos e ligninas de interações e modificações variadas.

A principal dificuldade durante o processo de produção de etanol, sem dúvida, é a recalcitrância da parede celular como descrito anteriormente, e um dos empecilhos na hidrólise enzimática é o custo elevado de enzimas e a quantidade necessária para desmontar o arcabouço lignocelulósico para obter glicose.

O complexo multienzimático das celulasas é denominado celulosomo, e é formado por: Endoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4); Exoglucanases, incluindo 1,4- $\beta$ -D-glucana glucanohidrolases, também conhecidos como celodextrinases (EC 3.2.1.74), 1,4- $\beta$ -D-glucana celobiohidrolases (EC 3.2.1.91); e  $\beta$ -glucosidases ou  $\beta$ -glucosídeo glucohidrolases (EC 3.2.1.21) (LYND et al., 2002).

As endoglucanases (EG) são atuantes nas regiões amorfas da cadeia polissacarídica da celulose, sendo que da hidrólise resultam oligossacarídeos de tamanhos variados. As exoglucanases operam nas regiões redutoras e não-redutoras expondo a glicose ou celbiose, sendo ainda que em sua atuação pode desgastar a estrutura microcristalina da celulose. As enzimas  $\beta$ -glucosidase realizam a hidrólise dos oligossacarídeos e celbiose em moléculas de glicose (LYND et al., 2002).

Frente às dificuldades enfrentadas para obtenção de glicose a partir do rígido material lignocelulósico e a busca por enzimas mais eficazes, a comunidade científica do mundo todo tem sido instigada a explorar recursos naturais com potencial catalítico e aplicável industrialmente. A exploração do mundo microbiano, por ser o mais rico em biodiversidade e capacidade enzimática para desestruturar a complexidade do composto celulósico, torna-se cada vez mais interessante.

## 2.5. Identificação molecular de procariotos presentes no solo

O solo de floresta contém aproximadamente  $4 \times 10^7$  células procarióticas em um grama de solo. O solo tem sido estimado com uma quantidade de bactérias em torno de  $4-6 \times 10^{30}$  incluindo  $10^6 - 10^8$  genomas individuais pertencentes a diferentes espécies (SLEATOR et al., 2008). A classificação filogenética com base na morfologia é relativamente mais simples em alguns eucariotos tendo em vista a riqueza de detalhes observáveis, ainda que complexos, quando comparados às bactérias, que apesar de sua aparente simplicidade estrutural, dificulta a diferenciação em grupos (WOESE, 1987).

A microbiologia tem passado por uma transformação durante os últimos 25 anos, que tem alterado a visão dos microbiologistas de como estudar certas peculiaridades dos micro-organismos. A percepção de que muitos dos micro-organismos não podiam ser cultivados em laboratório, fomentou uma revolução na área (GOULART et al., 2013).

Na década de 80, houve uma observação por parte de muitos microbiologistas ambientais que identificaram que apenas uma parcela dos organismos microscopicamente observáveis de uma amostra ambiental era capaz de formar colônias em meios de cultivo (TRINGE et al., 2005).

Em 2001, Kellenberger em seus estudos observou que 1g de solo contém cerca de  $10^7$  células, indicando que somente 0,1% destes micro-organismos são cultiváveis em laboratório, pela aplicação do método tradicional de análise microbiana. Em suma, 99,9% da diversidade genética de uma população microbiana não podem ser acessadas pela técnica microbiológica clássica. Diante destes relatos, estima-se que atualmente 0,1% dos micro-organismos existentes no planeta Terra foram descritos. A abordagem do cultivo limitou seriamente a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos micro-organismos pelos métodos convencionais, o qual necessita de um refinamento (PACE, 1997).

Em 1985, Kary Bank Mullis, que além de cientista investia parte de seu tempo ao surf, junto aos seus colaboradores, agitou a comunidade científica com a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que foi automatizada somente em 1989 com a

descoberta de *Taq* DNA polimerase termoestável (Hoffmann-la Roche Inc. & Cetus). A técnica permite amplificar pequenos fragmentos do genoma, podendo assim obter grande quantidade de cópias de uma região específica do DNA. Diversas técnicas moleculares utilizadas atualmente apropriam-se da técnica de PCR ou suas variações para o estudo de diversidade microbiana em diferentes ambientes. Este fato fez com que Mullis ganhasse o prêmio Nobel de química em 1993.

A utilização de genes constitutivos considerados como marcadores moleculares, vem sendo aplicados inicialmente com a obtenção de DNA metagenômico aliado a amplificação destas regiões, no estudo de diversidade microbiana em solos, e também em diversos outros ambientes.

Os RNAs ribossômicos (rRNA) são componentes essenciais na fisiologia celular, interagindo especificamente com proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos, atuantes na síntese protéica. São apontados como o principal produto da transcrição nas células, constituindo geralmente de 80 – 90% da massa de RNA total dos organismos. Os RNAs ribossômicos recebem sua classificação com base em seu coeficiente de sedimentação quando sob centrifugação, que depende tanto do tamanho, como da densidade da molécula, em unidades conhecidas como Svedberg (“S”). Os procariotos possuem três tipos de rRNAs: 5S (120 nucleotídeos), 16S (1542 nucleotídeos) e 23S (2904 nucleotídeos) (GORAB, 2001).

O gene 16S rRNA é utilizado na identificação de bactérias utilizando sequenciamento de DNA, seja ele proveniente de isolados ou metagenoma (HANDELSMAN et al., 1998; KAKIRDE et al., 2010), pois possuem sequencias conservadas e variáveis que são utilizadas como cronômetro molecular permitindo estimar distâncias filogenéticas. Este gene apresenta regiões conservadas entre as bactérias, e ao mesmo tempo, possui variabilidade suficiente para revelar relações filogenéticas entre espécies (WOESE, 1987; WEISBURG et al., 1991). Possui 1542 pares de bases (pb), baseado em modelo de *Escherichia coli*, com 9 regiões conservadas e 9 hipervariáveis, sendo o tamanho de cada região relativo dentre as bactérias como ilustrado por Petrosino e colaboradores (2009) (Figura 03).



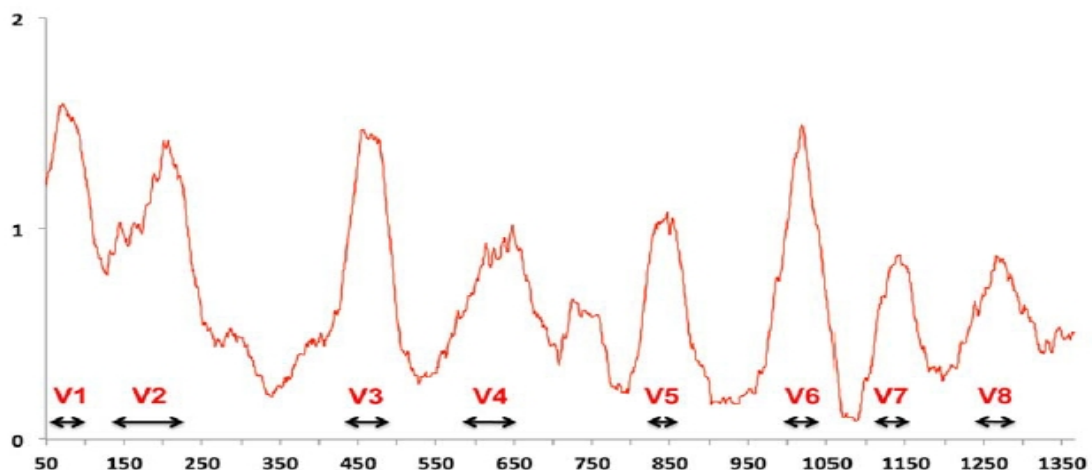


Figura 03: Regiões hipervariáveis no gene 16S rRNA baseado em modelo de *E. coli* (Fonte: Vasileiadis et al., 2012).

A clonagem e o sequenciamento do gene *16S rRNA*, a partir do DNA extraído diretamente de amostras ambientais como solo, águas dos oceanos e biofilmes contribui para um entendimento mais aprofundado da diversidade e da função das comunidades bacterianas destes ambientes (TRINGE et al. 2005). A tecnologia metagenômica vinculada a genes constitutivos com auxílio de PCR (WGA – whole genome amplification) alcança uma nova dimensão na caracterização de diferentes comunidades microbianas, o que desperta o interesse dos cientistas quanto à interpretação das ações desempenhadas pelos micro-organismos nos mais variados ambientes, incluindo o solo (GOULART et al., 2013). O 16S rRNA obtido da amostra de DNA total de um ambiente indicou aspectos de classificação, levando à uma nova forma de avaliar a diversidade genética dos procaríotos.

### 3. REFERÊNCIAS

CAMPBELL, C.D.; GRAYSTON, S.J.; HIRST, D.J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. **J. Microbiol Methods**. v. 30, p. 33–41, 1997.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_04\\_09\\_10\\_29\\_31\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_abril\\_2013\\_1o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_29_31_boletim_cana_portugues_abril_2013_1o_lev.pdf)>. Acesso em 25 junho, 2013.

FIERER, N.; STRICKLAND, M.S.; LIPTZIN, D.; BRADFORD, M.A.; CLEVELAND, C.C. Global patterns in belowground communities. **Ecology Letters**, v. 12, p. 1238-1249, 2009.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns on community-level, sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GORAB, E. **Evolução de genes nucleares de RNA ribossômico**. Biologia Molecular e Evolução. Cap. 6, p. 64-69, 2001.

GOULART, K. C. S.; OMORI, W. P.; MARCONDES, J. A. S. Metagenômica aplicada à biotecnologia. **Revista Ciência & Tecnologia**, 2013.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 155-164, 2005.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem Biol**, v. 5, p. 245-249, 1998.

JEONG, H. J.; KIM, J-T.; KIM, Y. J.; KIM, H-K.; LEE, H. S.; KANG, S. G.; KIM, S-J.; LEE J-H. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment Metagenome. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 81, p. 865–874, 2009.

KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p.1911-1923, 2010.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; van ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MARQUES, F. Cardápio energético: Cada país terá uma combinação própria de fontes limpas de energia para enfrentar as mudanças climáticas, conclui workshop. **Revista FAPESP** – Março, p.14-21, 2009.

MARQUES, F. Discórdia em Copenhague: A esperança de obter um acordo global para enfrentar o aquecimento foi adiada para dezembro na conferência da Cidade do México. **Revista FAPESP** – Janeiro, p. 28-31, 2010.

MORIMOTO, S.; FUJII, T. A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 83, p. 389–396, 2009.

PACE, N.R.; STAHL, D.J.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. **ASM News**, v. 51, p. 4-12, 1985.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: primeira ou segunda geração?. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 15 abril. 2011. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2011/producao-de-etanol-primeira-ou-segunda-geracao/#>>. Acesso em 25 junho, 2013.

PAPATHEODOROU, E.M.; EFTHIMIADOU, E.; STAMOU, G.P. Functional diversity of soil bacteria as affected by management practices and phenological stage of *Phaseolus vulgaris*. **European Journal of Soil Biology**, v. 44, p. 429-436, 2008.

PRESTON-MAFHAM, J.; BODDY, L.; RANDRESON, P.F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 1-14, 2002.

REYNOL, F. Bagaço de qualidade: Pesquisadores da Unicamp desenvolvem equipamento para facilitar a obtenção do etanol celulósico. **Revista FAPESP** – Janeiro, p. 72-73, 2010.

ROLF, R. The metagenomics of soil. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p.470-478, 2005.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J. & GOOGMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2541-2547, 2000.

SHELLER, H.V. & ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 61, p. 10.1-10.27, 2010.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Curr Opin Biotechnol**, v. 14, p. 303-310, 2003.

SCHTTER, M.; DICK, R. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. **Soil Biol. Biochem.** v. 33, p. 1481, 2001.

SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.

SIMON, C.; DANIEL, R. Construction of small-insert and large-insert metagenomic libraries. **Methods in Molecular Biology**, v. 668, p. 39-50, 2010.

SIX, J.; FREY, S.D.; THIES, R.K.; BATTEN, K.M. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, p.555-569, 2006.

SLEATOR, R. D. C.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. **Letters Applied Microbiology**, v. 47, p. 361-366, 2008.

STEELE, H. L.; JAEGER, K-E.; DANIEL, R.; STREIT, W. R. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenome. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 25-37, 2009.

STEFANOWICZ, A. The Biolog Plates Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial Communities. **Polish J. of Environ. Stu.** v. 15, p. 669-676, 2006.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

TRINGE, S.G. *et al.* Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, v. 308, p. 554-557, 2005.

von MERING, C.; HUGENHOLTZ, P.; RAES, J.; TRINGE, S.G.; DOERKS, T.; JENSEN, L.J. *et al.* Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. **Science**, v. 315, p.1126-1130, 2007.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**, v. 173, p. 697, 1991.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

ZAK, J. C.; WILLING, M. R.; MOORHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity as microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

## CAPÍTULO 2 – COMUNIDADE MICROBIANA EM SOLO SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

**RESUMO** – O solo possui alta diversidade microbiana comparado a qualquer outro ambiente. O uso da terra para cultivo de cana-de-açúcar amplia a dinâmica dos micro-organismos nos importantes processos como o de ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato. A microbiota presente no solo, além de diversa, abriga potenciais sistemas enzimáticos pouco explorados. Neste trabalho foi possível avaliar o perfil fisiológico da comunidade microbiana do solo e identificar procariotos de maior abundância e outros grupos atuantes em processos biológicos por meio do método de sequenciamento Sanger (WGA) e pela nova geração de seqüenciadores Illumina<sup>®</sup> (WGS). O perfil fisiológico da comunidade microbiana possibilitou observar a habilidade com que os micro-organismos degradaram importantes substratos de carbono, o que representa valor considerável em relação a mitigação da emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera e a capacidade de obter energia. O domínio de maior destaque foram as *Proteobacteria* (maior número de sequencias nas bases de dados), apontada como atuante principal dos diversos processos ecológicos. Construiu-se uma árvore de distância genética dos principais gêneros de bactérias, o que possibilitou estimar a relação dos grupos procarióticos obtidos. A caracterização da comunidade microbiana do solo foi estimada com sucesso indicando a dinâmica do ambiente como alto potencial metabólico, abrindo perspectivas para posteriores análises e aplicações.

**Palavras-chave:** 16S rRNA, metagenoma, EcoPlate, proteobactéria, diversidade, Illumina.

## CHAPTER 2 - MICROBIAL COMMUNITY IN SOIL UNDER OF SUGARCANE CULTIVATION

**ABSTRACT** – The soil has a high microbial diversity compared to any other environment. The use of land for growing sugar cane expands the dynamics of microorganisms in important processes such as nutrient cycling, nitrogen fixation and phosphate solubilization. The microbiota present in the soil, and diverse potential hosts enzyme systems underexplored. In this work it was possible to evaluate the physiological profile of the microbial community and identify the most abundant prokaryotes and other groups active in biological processes by means of the method of Sanger sequencing (WGA) and the new generation Illumina® sequencing (WGS). The physiological profile of the microbial community allowed to observe the skill with which microorganisms degrade important carbon substrates, which represents considerable value in relation to mitigation of CO<sub>2</sub> emissions into the atmosphere and the ability to obtain energy. The domain most prominent were the Proteobacteria (highest number of sequences in the databases), appointed as acting chief of several ecological processes. Constructed a tree of genetic distance of the main genera of bacteria, allowing to estimate the relationship of prokaryotic groups obtained. The characterization of soil microbial community was estimated successfully indicating the dynamics of the environment as high metabolic potential, opening perspectives for further analysis and applications.

**Keywords:** 16S rRNA, metagenome, Ecoplate, proteobacteria, diversity, Illumina.

## 1. INTRODUÇÃO

O solo é considerado o ambiente microbiano mais diverso do planeta (ROLF, 2005), com maior proporção de procariotos que qualquer outro ambiente (VAN ELSAS et al., 2006; ROESCH et al., 2007). Estima-se que um grama de solo pode conter mais de  $10^9$  células microbianas, representando mais de 10000 genomas (TORSVIK e OVREAS, 2002). Menos de 1% desta diversidade é considerada cultivável por meio das técnicas tradicionais (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003), sendo que os genomas destes micro-organismos incultiváveis representam um reservatório de novas enzimas e potencial metabólico (SIMON e ROLF, 2011).

O acesso à comunidade microbiana incultivável pode ser solucionado por meio da aplicação metagenômica, a qual tem sido extensivamente aplicada em estudos do solo (DEMANECHE et al., 2008; RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2008; VAL-MORAES et al., 2009; DELMONT et al., 2011).

A diversidade microbiana em ambientes como o solo, sedimentos ou água têm sido acessada pela análise de genes considerados “marcadores moleculares”, como os RNAs ribossômicos 16S rRNA, 18S rRNA e os espaçadores transcritos internos (ITS), devido a esses apresentarem regiões conservadas que podem ser utilizadas na comparação e classificação taxonômica dos micro-organismos (PETROSINO et al., 2009)

A composição comunidade microbiana é considerada como um indicador de qualidade do solo, sendo este um dos parâmetros utilizados no estudo de impactos ambientais causados principalmente por práticas agrícolas, bem como biomarcadores e biorremediação. De acordo com Reber e colaboradores em 1992, época de grande discussão no meio científico, o tempo para o ecossistema retornar ao seu estado inicial, após um distúrbio qualquer, define a resiliência do sistema. A diversidade das comunidades microbianas do solo está diretamente relacionada à sua resiliência. Uma pequena área de solo apresenta um número extraordinário de micro-habitats, e a variação de elementos físico-químicos, como temperatura, umidade e nutrientes dentro de cada um desses micro-habitats, aumenta ainda mais a diversidade de nichos disponíveis para as populações microbianas (ROESCH et al. 2007).

A aplicação de técnicas funcionais de maior amplitude para acessar o perfil fisiológico da comunidade microbiana, e a metagenômica podem mensurar a estrutura da comunidade microbiana. A análise da comunidade microbiana pela utilização de fontes de carbono é uma opção que têm sido empregada para estudos de diversidade. A aplicação de técnicas moleculares agregadas ao acesso à estrutura funcional têm se tornado cada vez mais difundidas, e são consideradas ferramentas imprescindíveis para se monitorar mudanças ambientais em função de diferentes formas de uso da terra. O acesso ao mundo microbiano em ambientes ricos, como o solo, apresenta certas limitações devido à heterogeneidade, complexidade e dinâmica deste ambiente (MORAIS, 2008).

Neste estudo, o objetivo foi estimar a diversidade do vasto mundo microbiano presente em um solo sob cultivo de cana-de-açúcar após colheita mecanizada, e avaliar a habilidade com que os micro-organismos degradam compostos carbônicos simples e complexos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas (LBMP) sob chefia da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Universidade Estadual Paulista (Unesp) Câmpus de Jaboticabal. As técnicas empregadas neste trabalho se enquadram nos padrões de biossegurança (NB-1) não conferindo riscos ao ambiente e ao ser humano.

A metodologia empregada neste trabalho está ilustrada conforme o diagrama (Figura 04).



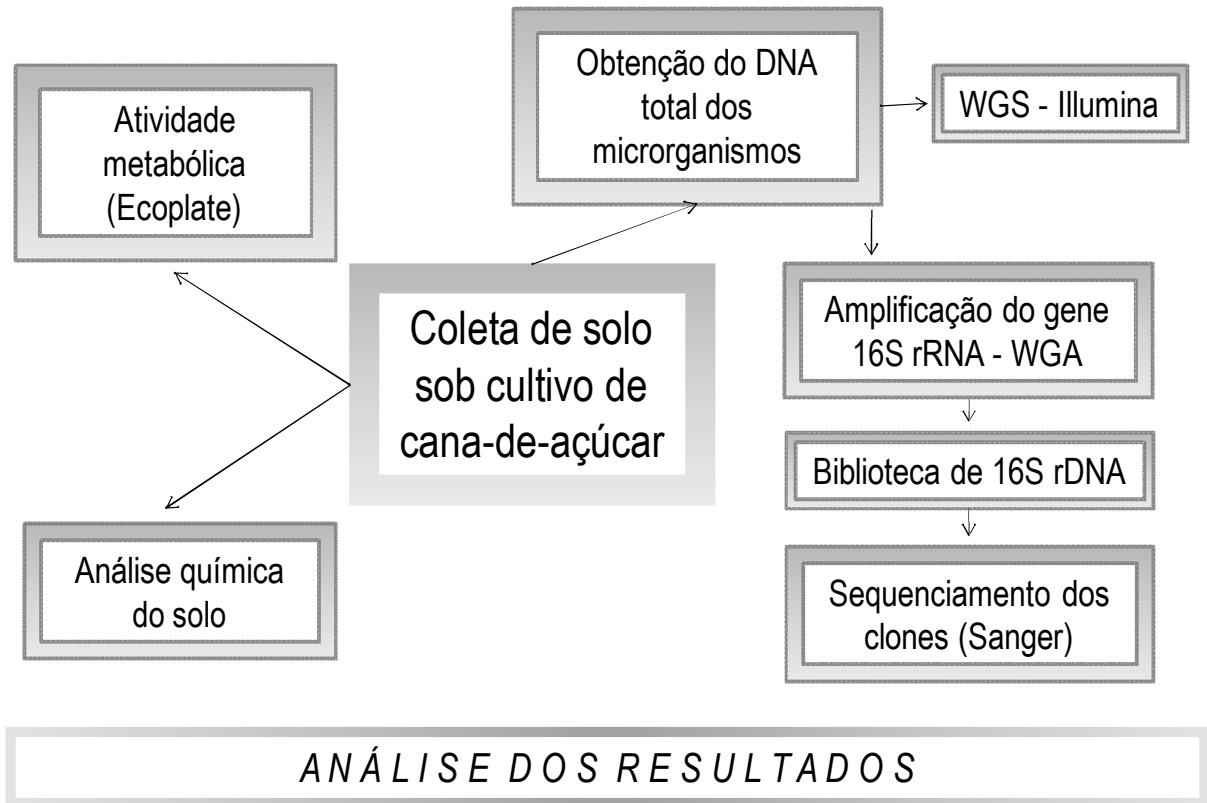


Figura 04: Diagrama ilustrativo das etapas experimentais.

### **Parte I – Diversidade bacteriana do solo**

#### **1. Área de amostragem e obtenção do DNA total dos microrganismos**

A coleta de solo foi realizada em área pertencente à Usina Pitangueiras Açúcar e Álcool, localizada na Estrada Vicinal Passidônio de Andrade Neto Km 8, na Fazenda Santa Rita, no município de Pitangueiras - Estado de São Paulo (Figura 05), no mês de agosto de 2009, inverno no Brasil.

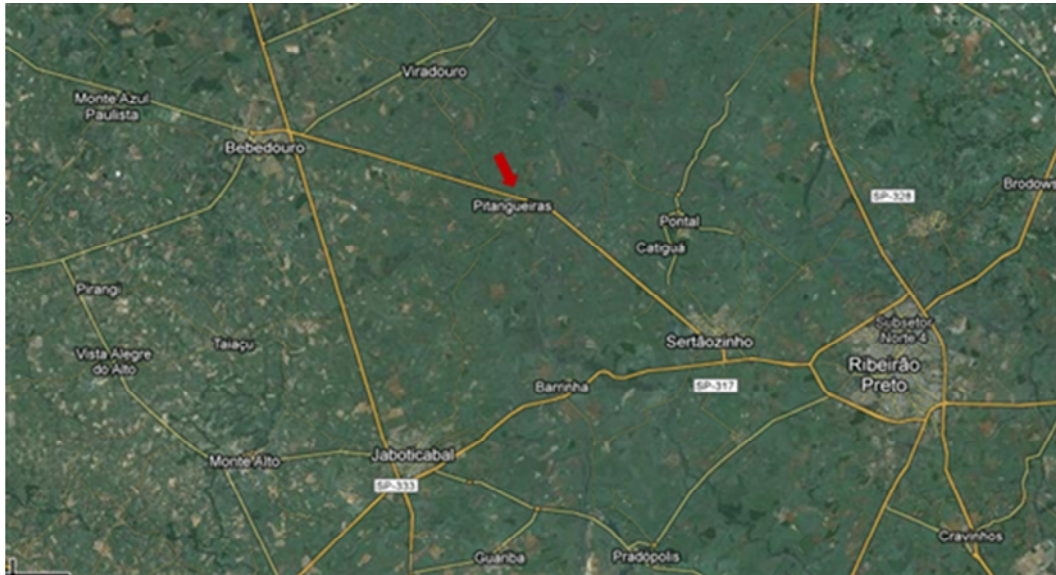


Figura 05: Imagem de satélite da região de Pitangueiras – SP (Fonte: Google Maps)

O método de coleta do solo foi realizado de acordo com metodologia proposta por Nunes et al. (2011), no qual a amostragem é realizada perpendicularmente à linha de plantio, com cinco pontos de coleta (um no centro da linha de plantio e mais dois de cada lado) em profundidade de 0-20 cm cada ponto. A distância entre os pontos é de 5 m sendo a área representativa de 25 m<sup>2</sup> (Figura 06). O solo coletado em cada ponto foi mantido sob refrigeração até o laboratório. A amostra dos 05 pontos foram unidas em uma única amostra onde foi homogeneizada, sendo esta representativa da área dos 25 m<sup>2</sup> do campo sobre palhada de cana-de-açúcar onde foi realizada a coleta. Da amostra única retirou-se 1 g de solo o qual foi conduzido à extração de DNA total.

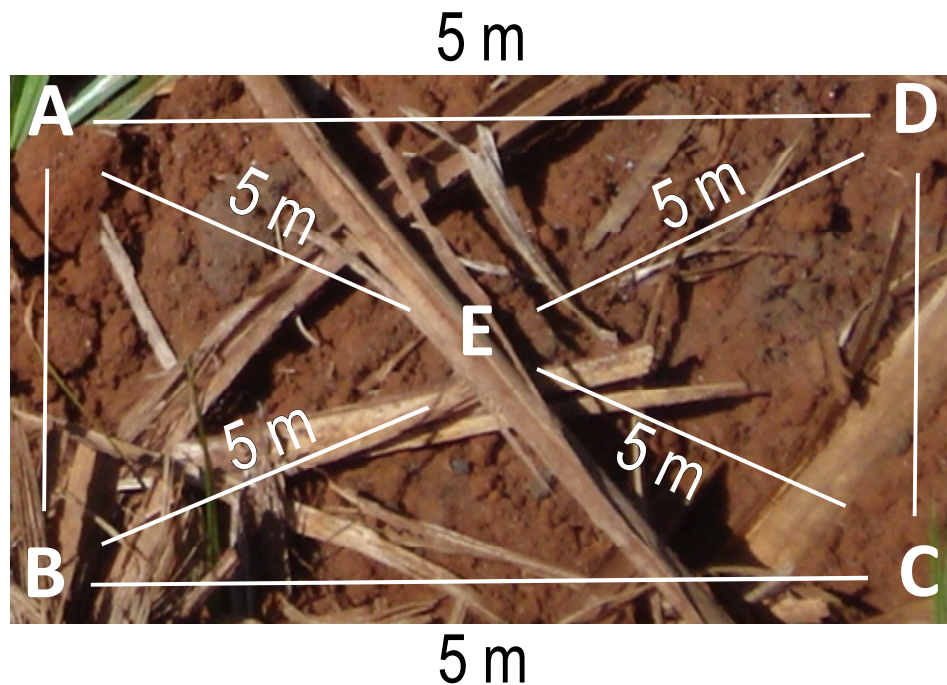


Figura 06: Área de amostragem do campo pós colheita mecanizada de cana-de-açúcar sobre palhada. A distância de 5 m entre os pontos A e B, B e C, C e D, e destes com o ponto E representam uma área total de 25 m<sup>2</sup>.

A coleta do solo foi realizada no campo após colheita mecanizada da cana-de-açúcar sem queima, contendo palhada sobre o solo, em área de 21,85ha referente ao talhão 66 de 2006 da variedade RB – 855453.

A extração de DNA total dos micro-organismos do solo (1 g) foi conduzida com o FastDNA® SPIN Kit for Soil (BIO 101 - Quantum Biotechnologies), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,6%, onde se comprovou adequação do material metagenômico às condições necessárias para os experimentos posteriores.

## **2. Amplificação do fragmento do gene 16S rRNA**

O gene 16S rRNA foi amplificado a partir do DNA total da amostra oriunda do solo coletado como descrito anteriormente, por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores (primers) fD1 (posição 8 – 27 de *E. coli*) e rD1 (posição 1524 – 1540 de *E. coli*) como descrito por Weisburg et al. (1991). A reação de amplificação do gene foi conduzida utilizando tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 50 mM KCl]; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase; 200 µM de cada dNTP; 5 pmols de cada primer e 35 ng do DNA total. A PCR foi realizada em termociclador modelo PTC-200 (MJ Research Inc.) com os seguintes parâmetros: 94°C/2min; 35 ciclos de 94°C/30s, 55°C/50s e 72°C/2min, e posteriormente à 72°C por 5min. Após a PCR, o amplicon de aproximadamente 1500 pb foram observados e avaliados em gel de agarose 1%. Posteriormente à amplificação do gene, este foi submetido à purificação em coluna Wizard® PCR Clean-Up System (Promega) a fim de obter o máximo de pureza eliminando possíveis restos de reação. A quantidade de material genético foi observada em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 (ThermoScientific).

## **3. Construção da biblioteca de sequencias de 16S rDNA**

O fragmento de DNA referente ao gene 16S rRNA amplificado e purificado, foi submetido à ligação em vetor pJET (Figura 07) e à transformação em células de *E. coli* DH10B seguindo a orientação descrita no protocolo do “Clone JET™ PCR Cloning Kit” (Fermentas).

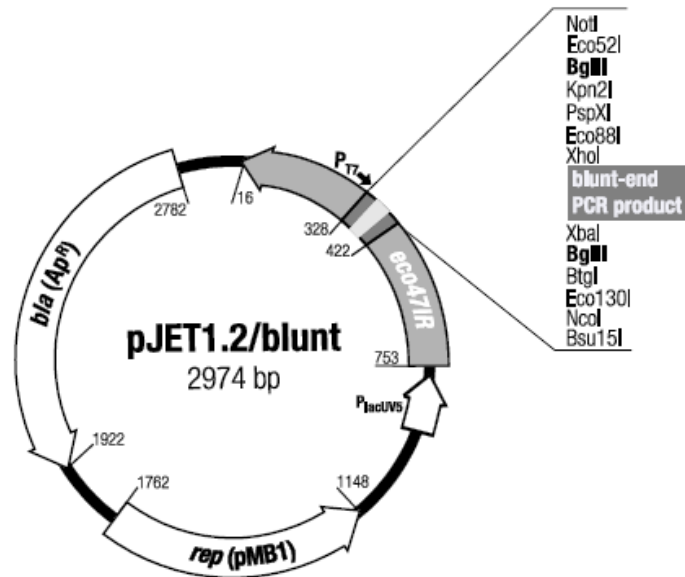


Figura 07: Ilustração do mapa do vetor pJET1.2

Os clones obtidos, num total de 277, foram coletados com palito de madeira esterilizado e transferidos em microplacas de 96 poços (Costar 3799 – Corning Incorporated), contendo meio de cultivo LB (Luria Bertani) acrescidos de 100 µg de ampicilina. O DNA plasmidial dos clones foi extraído segundo protocolo estabelecido por Sambrook e Russel (2001) e, posteriormente, avaliado em gel de agarose 0,8%. A biblioteca de clones do gene 16S rRNA está devidamente estocada em -80°C no LBMP.

#### 4. Sequenciamento Sanger dos insertos de 16S rDNA

As reações de sequenciamento dos fragmentos de 16S rDNA foram realizadas nas seguintes condições: 10 pmol do primer pJET1.2 “forward”; 1,5 µl de “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit”; 100 ng do DNA plasmidial e 3 µl de tampão 2,5x [400 mM Tri-HCl pH 9,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>]. A reação foi conduzida a 95°C/3min seguida de 25 ciclos de 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/1min. As amostras amplificadas foram desnaturadas com 9 µl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) por 5 min a 95°C e levadas ao sequenciador capilar modelo 3100 DNA Analyser ABI Prism.

## **5. Ferramentas de análise das sequências de 16S rDNA geradas pelo sequenciamento Sanger WGA**

As sequências foram avaliadas pelos programas Phred/Phrap/Consed (EWING e GRENN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998; GORDON et al., 2001; GORDON, 2004), e somente sequências com qualidade acima de 20 foram utilizadas para as posteriores análises (o que indica a confiabilidade de 99 % de que seja aquela base; um erro a cada 100). Trechos sequenciados com partes de vetor foram excluídos pelo Banco de dados VecScreen e o alinhamento múltiplo foi feito no software ClustalW (THOMPSON et al., 1994). As quimeras (sequências diferentes) foram analisadas no Bellerophon (HUBER et al., 2004) e comparadas com os Bancos de dados “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn e Ribosomal Database Project (RDPII) por meio das ferramentas Classifier e Seqmatch (WANG et al., 2007).

A construção do fenograma foi realizada no MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011) utilizando o método Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 repetições, e a matriz de substituição de nucleotídeos Jukes-Cantor. A classificação dos taxons e a frequência de Filos, Classes e Gêneros foram obtidas a partir da ferramenta Classifier. Os programas “Distance Based OTU” e “Richness Determination” (DOTUR) (SCHLOSS et al., 2005) foram utilizados para estimar as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), índices de riqueza Chao1 (CHAO, 1984), Ace (CHAO e LEE, 1992; CHAO et al., 1993) e os índices de diversidade Shannon-Weaver e Simpson (MAGURRAN, 1988). Após a obtenção da matriz de distância a partir do alinhamento, foi utilizada a ferramenta DNADIST presente no *software* Phylip. A curva de rarefação com 3, 10 e 20% de distância genética foi gerada pelo software DOTUR (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005).

## **6. Análise do metagenoma por sequenciamento Illumina® WGS**

O DNA total dos micro-organismos do solo foi submetido ao sequenciamento pela responsável técnica Camila Cesário Fernandes. A construção da biblioteca de DNA metagenômico foi preparada conforme protocolo *TruSeq® DNA Sample*

*Preparation v2* (Illumina®) seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento da biblioteca metagenômica de DNA total do solo foi realizada com a plataforma Illumina®, equipamento *HiScanSQ*, utilizando os kits *Paired-End Cluster Generation Kit v3* (Illumina®) e *TruSeq™ SBS Kit v3 - 200 Cycles* (Illumina®) seguindo as recomendações do fabricante. A corrida nas condições descritas pode fornecer *reads* em duplicata com até 75 pb, com rendimento de 200 milhões de *reads*.

Ao término do sequenciamento, as bibliotecas foram demultiplexadas e os arquivos.bcl gerados foram modificados para formato fastq com a utilização do programa CASAVA 1.8.3. (Illumina). Os dados gerados são extensos, devido à alta capacidade de gerar sequencias pela tecnologia de sequenciamento de DNA aplicada. Assim sendo, os dados totais gerados requerem maior tempo para serem processados, sendo estes apresentados neste trabalho como resultados preliminares do montante à ser analisado.

O total de sequencias geradas foi em torno de 65 milhões, sendo que uma parte correspondente a 0,18% foi utilizada para análise. Os dados foram submetidos ao programa *WebCarma* para identificação, classificação dos micro-organismos e categorias funcionais presentes na microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

## **Parte II – Propriedades químicas do solo**

Os atributos químicos do solo sob cultivo de cana-de-açúcar foram obtidos por análise realizada no Departamento de Solos da FCAV. A análise incluiu valores de pH, matéria orgânica, K (potássio), Ca (cálcio), Cu (cobre), Fe (ferro) dentre outros, o que possibilitou avaliar aspectos relacionado à condição ambiental a qual está a comunidade microbiana local.

### **Parte III – Perfil metabólico da comunidade bacteriana cultivável do solo**

#### **1. Obtenção do perfil funcional do solo por Ecoplate**

A determinação do perfil metabólico da comunidade microbiana por padrão de utilização de substratos foi determinada com microplacas Biolog Ecoplate conforme protocolo estabelecido por Bloem e colaboradores (2006). Os substratos de carbono e seus respectivos grupos são os 4 diferentes polímeros (glicogênio,  $\alpha$ -dextrina, Tween 40 e 80); 8 tipos de carboidratos (D-celobiose,  $\beta$ -metil-D-glicosídeo, N-acetil-D-glicosamina, i-eritritol, D-xilose, Ácido-D-galacturônico,  $\alpha$ -D-lactose e D-manitol); 6 aminoácidos (L-serina, L-fenilalanina, L-arginina, L-treonina, L-asparagina e Ácido glicil-L-glutâmico); 2 amida/amina (Feniletanina e Putrescina); 2 miscelânea (D-L- $\alpha$ -glicerolfosfato e glicose-1-fosfato); 2 tipos de compostos fenólicos (Ácido-2-hidroxibenzóico e Ácido-4-hidroxibenzóico) e 7 compostos de ácido carboxílico (Ácido- $\gamma$ -hidroxibutírico, Ácido-D-glicosamínico, Éster metílico do ácido pirúvico, Ácido-itacômico, Ácido-D-galacturônico, Ácido- $\alpha$ -cetobutírico e Ácido D-málico) (Tabela 01).



<b>Substratos</b>	<b>Fonte de carbono</b>	<b>Substratos</b>	<b>Fonte de carbono</b>
<b>Polímeros</b>	glicogênio	<b>Aminoácidos</b>	L-serina
	$\alpha$ -ciclodextrina		L-fenilalanina
	Tween 40		L-arginina
	Tween 80		L-treonina
<b>Carboidratos</b>	D-celobiose		L-asparagina
	$\beta$ -metil-D-glicosídeo		Ácido glicil-L-glutâmico
	N-acetil-D-glicosamina	<b>Amina/Amida</b>	
	i-Eritritol		
	D-xilose		Feniletlanina
	Ácido-D-galacturônico		Putrescina
	$\alpha$ -D-lactose		
	D-manitol		
<b>Ácido carboxílico</b>	Ácido $\gamma$ -hidroxibutírico	<b>Miscelânea</b>	D,L- $\alpha$ -glicerolfosfato
	Ácido D-glicosamínico		Glicose-1-fosfato
	Éster Metílico do ac pirúvico	<b>Fenólico</b>	
	Ácido Itacônico		Ácido-2-Hidroxibenzóico
	Ácido-D-galacturônico		Ácido 4-Hidroxibenzóico
	Ácido $\alpha$ -cetobutírico		
	Ácido D-málico		

Tabela 01: Grupos de carbono presentes nas placas Biolog Ecoplate

Uma amostra de 10 g de solo dos cinco pontos de 0-20 cm unidos em uma única amostra foram adicionados em frascos erlenmeyer contendo 190 ml de solução salina (NaCl 0,85%) em condições estéreis. A suspensão foi submetida à agitação orbital de 220 rpm em temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, após 4 min de decantação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos esterilizados e centrifugados a 6300 x g por 20 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em 20 ml de solução salina (0,85 %). Após 2 h de decantação em temperatura ambiente, alíquotas de 120  $\mu$ l dos sobrenadantes foram adicionadas às cavidades da microplacas. As placas foram incubadas a 28°C (GOVAERTS et al. 2007) por 48 h. Após este período, a cada 24 h foram realizadas leituras em espectrofotômetro leitor de microplacas Microplate Manager® 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 490 nm, até a obtenção da média de desenvolvimento de cor (*average well color development, AWCD*) de 0,8-1,0

unidades de absorvância conforme adaptado (GARLAND e MILLS, 1991; ZAK et al., 1994).

## **2. Análise da resposta metabólica da comunidade microbiana no sistema Biolog**

As microplacas Biolog Ecoplate são compostas por 31 fontes de C mais um controle (água), dispostos em triplicata e fornecem o nível do perfil fisiológico da comunidade microbiana (*Community Level Physiological Profiling* - CLPP). Foram utilizados dois parâmetros para descrever a comunidade microbiana:

- (i) Resposta metabólica média (“average metabolic respond” – AMR), a qual descreve a média de respiração pela redução de tetrazólio na utilização das fontes de C pela comunidade microbiana conforme a equação:  $AWCD = \sum (w_a - w_o) / n$
- (ii) Diversidade metabólica da comunidade (“community metabolic diversity” – CMD) representada pelo número de substratos utilizados pela comunidade microbiana, sendo análogo à riqueza funcional da comunidade calculada pela somatória do número de respostas positivas observadas quando a D.O (densidade óptica) for  $\geq 0,25$ . Cada um destes parâmetros é relacionado ao tempo de incubação e fornecem a cinética metabólica da comunidade microbiana cultivável.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Propriedades do solo**

O pH do solo em análise apresentou valor 4.8, considerado ácido e propicia abundância de certos grupos bacterianos como as *Proteobacteria*, adaptadas à ambientes que possuem certa acidez, sendo importantes no ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre dentre outras contribuições ecológicas (KERSTERS et al. 2006) (Tabela 02).

pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn	S-SO4	Al
<i>em CaCl2 g/dm3</i>	<i>resina mg/dm3</i>					<i>nmol/dm3</i>			<i>%</i>			<i>mg/dm3</i>				<i>nmolc/dm3</i>
4.8	28	50	2.3	31	17	64	50.3	114.3	44	0.38	1.5	20	25.2	1.0	26	2

Tabela 02: Propriedades químicas do solo sob cultivo de cana-de-açúcar pós-colheita mecanizada na área de 25 m do campo.

A soma de Bases (SB) é a soma dos valores de potássio (K<sup>+</sup>), magnésio (Mg<sup>2+</sup>) e Cálcio (Ca<sup>2+</sup>), enquanto a capacidade de troca catiônica potencial do solo (T) representa a capacidade total de troca de cátion (CTC) no solo (SB + H + Al). A capacidade apresentada pelo solo de troca de íons representa uma tendência à liberação de vários nutrientes, reduzindo ou até evitando efeitos tóxicos causados pela aplicação de fertilizantes, favorecendo assim a manutenção da fertilidade por um longo período. A razão entre SB e T, demonstra a porcentagem de saturação por bases (V%), quanto maior o valor de V mais a CTC se ocupa com os cátions essenciais (SB).

O pH do solo é conhecido por possuir um efeito considerável na comunidade microbiana e em processos biogeoquímicos nos quais os micro-organismos mediam.

Como controle experimental foi utilizado solo de interior de mata, sendo o mesmo submetido à análise química apresentando teor de matéria orgânica de 23 g/dm<sup>3</sup>, valor este próximo ao solo em análise de 28 g/dm<sup>3</sup>. É importante ressaltar a importância da cobertura vegetal para atividade decompositora da matéria orgânica pela comunidade microbiana local, o que influencia positivamente no sequestro de carbono, minimizando a emissão de gases que contribuem para o efeito estufa. A manutenção da palhada sobre o solo é fundamental para o equilíbrio ecológico do sistema. Em solo sob cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de vinhaça o teor de matéria orgânica foi de 20 g/dm<sup>3</sup>, mais baixo quando comparado ao solo em análise, o que possivelmente indica menor atividade microbiana. Quando comparamos com solo com pouca palhada e adubado, o teor de matéria orgânica é ainda menor de 6 g/dm<sup>3</sup>, deixando evidente a importância da manutenção de palhada para que a atividade degradadora da matéria orgânica pelos microrganismos possa ser eficiente sem agressão ao meio ambiente, auxiliando na mitigação de gases. Deixar o solo

descoberto faz com que todo o carbono seja liberado ao meio ambiente, causando desequilíbrio ambiental por causa da ineficiência do ciclo do carbono. De fato é indiscutível a importância de manter o solo após colheita da cana-de-açúcar com resíduos de palhada. O solo sob cultivo de cana-de-açúcar com palhada foi o que apresentou maior quantidade de matéria orgânica em relação aos outros solos e ao controle, portanto, compostos como carbono, fósforo são essenciais para a manutenção dos ciclos biogeoquímicos. A presença de micro-organismos solubilizadores de fosfato é consequência da alta concentração de P em nossas análises de  $50 \text{ mg/dm}^3$  em relação aos outros solos que variaram de 33 à  $37 \text{ mg/dm}^3$ , sendo este nutriente um dos principais para a produção de culturas e deficiente em solos naturais. A quantidade de Fe, Mg e % de V atua diretamente influenciando a ciclagem dos nutrientes (OMORI, 2011).

O pH afeta a forma química, concentração e disponibilidade de substratos no solo, influenciando diretamente no crescimento e atividade celular (KEMMITT et al., 2006). Há forte evidência de que o pH do solo é determinante na diversidade bacteriana e na estrutura da comunidade em escala global (FIERER e JACKSON, 2006). As comunidades microbianas do solo sofrem forte influência do pH e da relação C/N (FIERER et al. 2009). Fatores sazonais, físicos e fisico-químicos podem ser relevantes na estrutura da diversidade da comunidade microbiana conforme discutido por Faoro e colaboradores em 2010.

Práticas de incorporação de compostos orgânicos elevam o pH, aumentam valores de m.o, P, K, Ca, Mg, capacidade de troca de cátions (T) e saturação por bases (V%) (VIEIRA et al., 2011).

O sistema de manejo da cana-de-açúcar neste trabalho foi plantio direto, fator crucial na composição da comunidade microbiana do solo. O conhecimento de como a função e a diversidade dos micro-organismos é afetado por variações causadas pelo manejo agrícola, pode ser fundamental para o emprego de práticas sustentáveis (PEIXOTO et al., 2010).

A Biomassa Microbiana (BM) é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo com aproximadamente 2% do carbono orgânico. A biomassa global de procaríotos pode conter  $85\text{-}130 \times 10^9$  toneladas de N e  $9\text{-}14 \times 10^9$  toneladas de P, representando o maior reservatório desses nutrientes em organismos vivos

(LAMBAIS et al., 2005). A BM é um indicador para se detectar efeitos dos sistemas de manejo nas propriedades biológicas e bioquímicas do solo, por ser muito sensível às alterações causadas pelo aumento no teor da matéria orgânica, tipo de cultivo e outras práticas com rotação de cultura e adubação. O uso destes parâmetros como indicadores de qualidade do solo pode ser comprometido, uma vez que a abundância e atividade dos micro-organismos são muito sensíveis às variações sazonais como temperatura e umidade (MORAIS, 2008).

A comunidade microbiana é afetada pela estrutura e composição da vegetação de cobertura, em virtude da liberação de formas específicas de carbono que podem representar importantes fontes de energia (GARBEVA et al., 2004). Além disso, as comunidades microbianas do solo sofrem forte influência do pH do solo e da relação C/N (FIERER et al., 2009), fatores que são totalmente alterados quando se corrige o solo com acréscimo de calcário e fertilizantes. O emprego de métodos que aferem microbiologicamente o solo para indicar sua qualidade tem sido alvo de pesquisas, devido aos micro-organismos manterem uma relação íntima com os aspectos químicos e físicos do solo. A microbiota reflete as alterações naturais e antropogênicas que ocorrem no solo, por isso é interessante e fundamental conhecer o máximo deste rico ambiente.

Eventualmente, após alterações nas condições do ambiente, as comunidades microbianas buscam adaptar-se para atingirem um novo equilíbrio (BALSER et al., 2002). Quando o ambiente do solo sofre alterações, a composição da comunidade microbiana será modificada por organismos mais adaptados às novas condições bem como por adaptações evolutivas dos organismos pré-existentes.

De acordo com Elsas et al. (2002), o manejo do solo tem grande influência sobre as comunidades bacterianas do solo, sendo verificado em seus estudos que o nível de agregação do solo teve maior efeito nas comunidades do que fatores como pH e tipo de entrada de compostos orgânicos. Estes fatores que influenciam diretamente na diversidade bacteriana do solo foram discutidos por Souza et al. (2012). Posterior às alterações nas condições do ambiente, as comunidades microbianas buscam adaptar-se para atingirem um novo equilíbrio (BALSE et al., 2002).

### **3.2. Identificação da comunidade bacteriana do solo por meio do sequenciamento Sanger - WGA**

A biblioteca resultou em 277 clones de 16S rDNA, dentro dos quais trabalhamos com 39 sequências de qualidade, e dentre estas, os filos predominantes foram *Proteobacteria* (28%), *Actinobacteria* (26%) e *Firmicutes* (21%), seguidos por *Acidobacteria* (10%) e outros de menor proporção (Figura 08) seguindo de certa forma o que tem nas Bases de dados. Em termos de metagenoma, é interessante destacar a proporção de “Bactéria não classificada”, correspondendo a 8% (Figura 07), situação comum em se tratando de amostra metagenômica. A descrição destas sequências ainda não foi suprida nos atuais bancos de dados, como NCBI e RDPII, e denotam a importância de ampliar os estudos metagenômicos, associando às técnicas clássicas de microbiologia e biologia molecular, para efeito de classificação taxonômica e contribuição aos bancos com novos táxons.

Tendo em vista trabalhos que destacam a pequena proporção de microorganismos passível de ser cultivada em laboratório, é de se esperar, ao aplicar técnicas metagenômicas de acesso ao DNA total, encontrar grande parte de sequências sem similaridade com qualquer outra que já tenha sido descrita nos bancos de dados, até o momento.

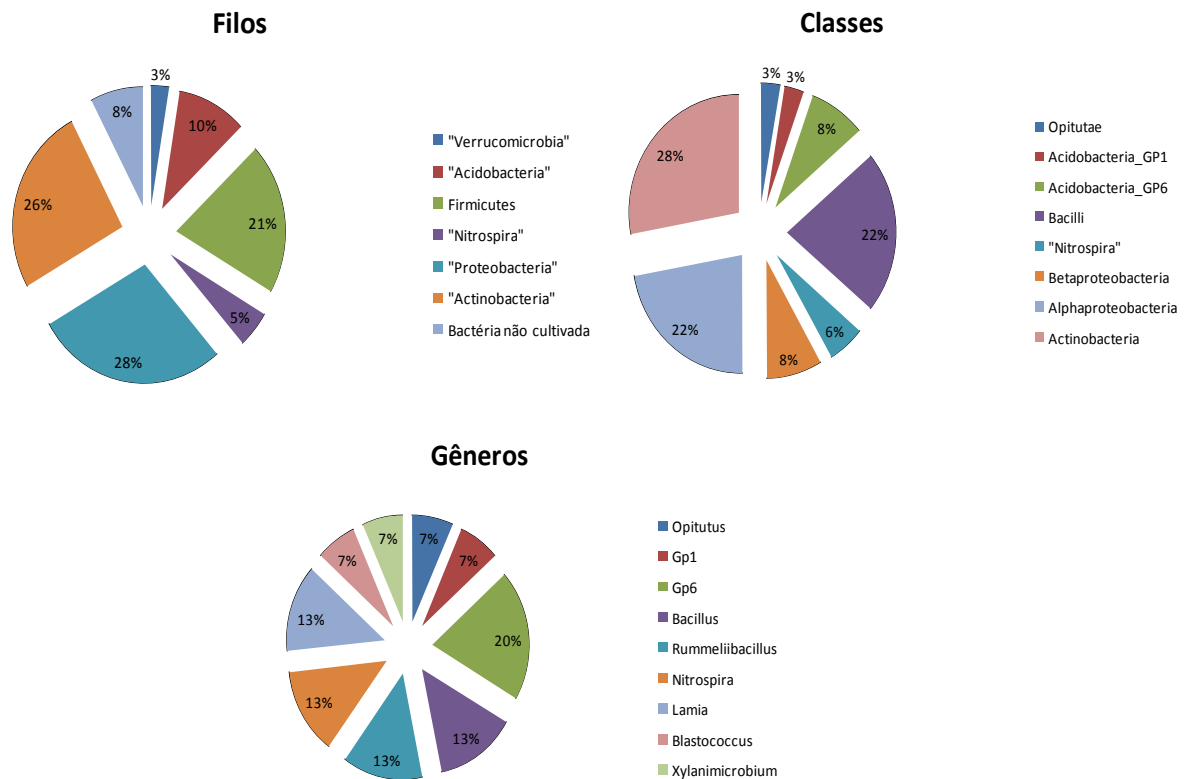


Figura 08: Classificação das OTUs (*Operation Taxonomic Unit*) representativas da comunidade microbiana do solo do total de 39 sequencias.

*Proteobacteria* e *Actinobacteria* são os grupos mais abundantes no solo (JANSSEN, 2006). O filo *Proteobacteria* é tipicamente observado em clones de bibliotecas oriundas de amostras ambientais de solo (JANSSEN, 2006; SPAIN et al., 2009) e abrange alto nível de diversidade morfológica, fisiológica e metabólica, sendo de grande importância no ciclo global de carbono, nitrogênio e enxofre (KERSTERS et al., 2006). *Proteobacteria* é um representante importante das bactérias solubilizadoras de fosfato. De fato, os dados químicos do solo indicaram alto teor de fósforo e, conseqüentemente, o grupo de maior abundância foi *Proteobacteria*.

O filo *Actinobacteria* inclui representantes importantes na formação da matéria orgânica do solo em ecossistemas terrestres (De ANGELIS et al., 2011). Possui uma variedade morfológica e traços em sua história de vida, incluindo esporulação, o que pode ser vantajoso para dispersão em longas distâncias. Ocorre certa discussão no meio científico se *Actinobacteria* é endêmica ou se têm distribuição cosmopolita (WAWRIK et al., 2007). Nas análises observou-se o alto teor de matéria orgânica

disposta no solo o que corrobora o fato de termos presente este filo como forte atuante na decomposição destes compostos orgânicos para a ciclagem dos nutrientes, importante para o solo sobre plantio de cana-de-açúcar, no que se refere aos ciclos biogeoquímicos, bem como, o sequestro de carbono pela microbiota local.

A matéria orgânica possui importância no fornecimento de nutrientes, na retenção de cátions, na infiltração e retenção de água no solo, na estabilidade da sua estrutura física e na atividade da comunidade microbiana. Logo, trata-se de um componente fundamental para a capacidade produtiva do solo. A queima da cana-de-açúcar é uma prática prejudicial pelo fato de que a matéria orgânica carbonizada altera indiretamente os ciclos biogeoquímicos e os processos microbianos no solo.

Em termos de Classe, *Actinobacteria* foi a que apresentou a maior proporção (28%), juntamente com *α-Proteobactéria* e *Bacilli*, ambas com 22% de representação. O grupo *Nitrospira* correspondeu a 6% em termos de classe e 13% em termos de gênero. Apesar de sua baixa representação, este grupo bacteriano tem importância fundamental em termos ecológicos e biotecnológicos para o cultivo de cana-de-açúcar. *Nitrospira* está presente em ambientes aquáticos, atua no ciclo do nitrogênio por meio da oxidação do nitrato; porém, também tem sido encontrados indivíduos em amostras de solo, acreditando-se ter atividade semelhante em ambos os ambientes (FAORO, 2006).

O gênero *Acidobacteria*, considerado o mais diverso filogeneticamente, está representado pelas subdivisões Gp1 e Gp6. Até 2011, apenas 212 acidobactérias estavam descritas no RDP-II, sendo que 29 % destas são pertencentes à subdivisão Gp1.

A análise realizada neste estudo mostrou pela árvore de distância (Figura 09) uma similaridade entre sequências de 16S rDNA de bactérias não-cultiváveis, não-classificadas ou desconhecidas com micro-organismos já classificados e depositados no Banco RDP-II. A ilustração de um dendograma foi feita para estimar o quão distantes estão as sequências, o que não infere em nada em termos filogenéticos e evolutivos. A construção do dendograma foi realizada somente para conhecimento da relação entre os grupos encontrados.

O detalhamento filogenético e a taxonomia de sequências do gene 16S rRNA tem sido tradicionalmente o principal foco em estudos de diversidade do solo (SPAIN



et al., 2009; PETROSINO., 2009). A diversidade de fauna e flora é bem conhecida, mas, pouco se sabe sobre a diversidade microbiana, particularmente do solo e as características que influenciam na composição e distribuição de bactérias presentes.

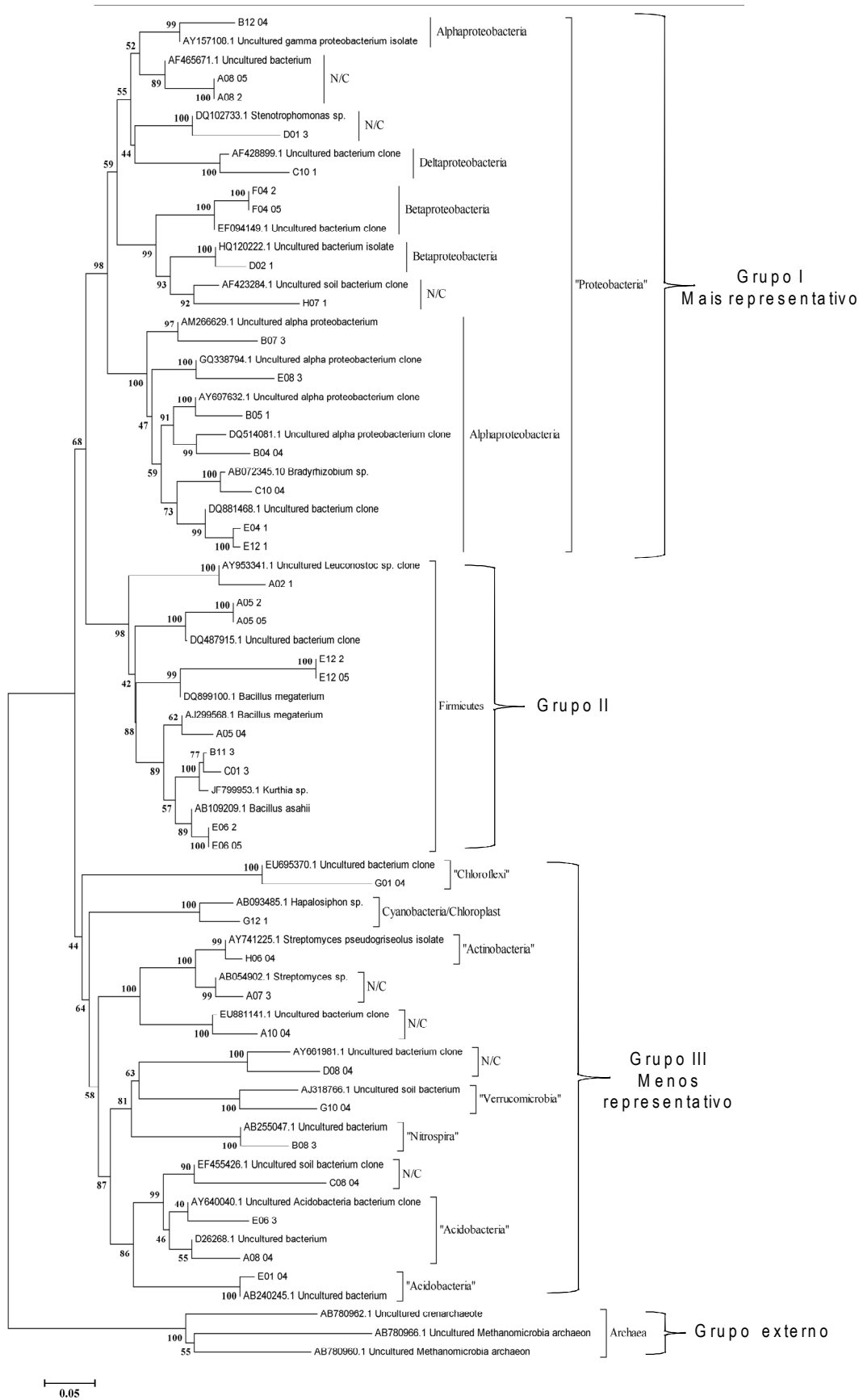


Figura 08: Fenograma das sequencias de bactérias do solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

*Acidobacteria* que foi o 3º mais abundante na classificação de OTUs não teve boa representatividade no fenograma.

O método de exploração da comunidade bacteriana pela aplicação metagenômica foi suficiente para identificar micro-organismos com possível potencial biotecnológico, tendo em vista os grupos identificados. As bactérias degradadoras de carbono certamente estão direta ou indiretamente relacionadas à quebra da celulose e hemicelulose, por exemplo, podendo estas ser futuramente estudadas para fins biotecnológicos. O grupo I possui representantes com alta atuação de metabolização, os quais abrigam enzimas ainda de difícil obtenção e consórcios bacterianos trabalhando em sinergismo que devem ser estudados com atenção.

O programa DOTUR permitiu determinar o número de Unidades Taxonômicas Operacionais, por meio da elaboração de uma matriz de distância. Uma vez atribuídas OTUs às sequências, foi possível determinar a curva de rarefação indicativa da frequência na qual cada OTU foi observada. O desenho desta curva é um importante parâmetro para estimar a riqueza de espécies alcançadas na análise e adicionalmente indica o quanto à abrangência observada foi suficiente para revelar a diversidade total da comunidade amostrada.

A curva de rarefação (Figura 10) gerada evidencia que não houve captura de toda a diversidade de bactérias presentes, o que levaria a contínuas análises até atingir a saturação de identificação microbiana disposta no solo. O que significa a aplicação metodológica descrita no próximo capítulo, com abordagem metagenômica WGS que é mais informativa e apresenta custo benefício mais reduzido que WGA – Sanger. Conforme o esperado, as 39 sequências não são suficientes para atingir a diversidade real do solo analisado, visto que a ferramenta DOTUR é sensível ao número de sequências analisadas; ou seja, esses valores podem ser alterados com o aumento de sequências amostradas. Os índices de diversidade Simpson e Shannon-Weaver confirmam a alta diversidade observada pelos estimadores, visto que apresentaram valores de 0,01349 e 3,31 respectivamente.

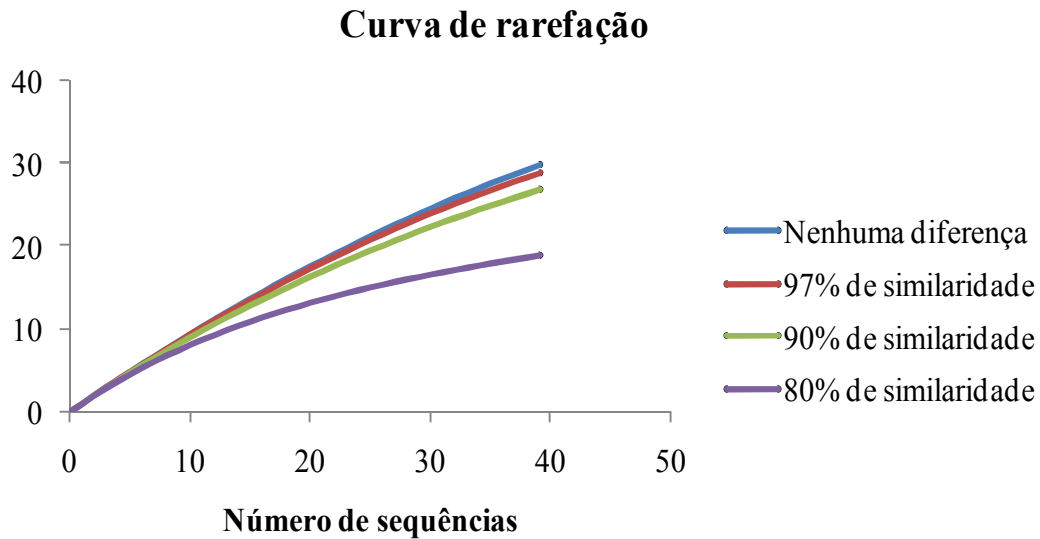


Figura 10: Curva de rarefação indicando o número de OTUs da biblioteca de clones do 16S rDNA oriundas da microbiota bacteriana presente no solo sob cultivo de cana-de-açúcar. As OTUs são ilustradas por 3, 10 e 20% de distância genética no sentido F.

O gráfico da curva de rarefação representa 39 OTUs. O estimador ACE (máximo) e Chao (mínimo) (Tabela 03) mostram uma diversidade de 565 e 445 OTUs respectivamente.

Índice de diversidade		Estimadores de riqueza	
Simpson	Shannon-Weaver	ACE	Chao1
0,01349	3,31	565	445

Os valores dos índices e estimadores foram obtidos a partir da distância de 0,03.

Tabela 03: Índices de diversidade e estimadores de riqueza da comunidade microbiana do solo

O estimador não-paramétrico ACE (*Abundance Based Coverage Estimator*) é baseado no conceito de abundância (LEE; CHAO, 1994) o que implica em fornecer maior peso nas análises aos grupos de maior frequência. O estimador não-paramétrico Chao1 utiliza a relação entre o número de *singletons* (sequências que aparecem uma única vez) e *doubletons* (sequências que aparecem duas vezes) para as estimativas de riqueza, o que significa que as sequências raras são contabilizadas com peso maior nas análises (COLWELL, 1997). O índice de

diversidade Simpson representa que quanto maior o valor, maior a dominância de 1 ou poucas espécies. Exprime a abundância das espécies mais comuns (Simpson, 1949). Já o Shannon-Wiener ( $H'$ ) dá maior peso para espécies raras, prevalecendo o componente de riqueza de espécies – considerado medida de incerteza. Quanto maior o  $H'$ , maior a incerteza.

Os dados de Omori (2011) mostram algumas semelhanças com os que obtivemos e algumas diferenças. Podemos constatar que estamos mais próximos de 1 do que relata Omori (2011) com 0,0013 em seus resultados. O valor de Simpson costuma variar de 0 a 1, onde um valor tendendo a 1 significa que ocorre grande probabilidade de as duas sequências pertencerem ao mesmo táxon. Ou seja, podemos concluir que temos mais grupos pertencentes ao mesmo táxon do que os dados de Omori. Quanto mais abaixo de 1, neste caso, maior diversidade. O índice Shannon de 3,96 de Omori apresenta pouco mais elevado em relação ao nosso de 3,31 o que indica espécies mais raras e em nosso trabalho espécies raras também, porém, com maior abundância de grupos semelhantes. Quanto menor for o valor do índice, menor será a diversidade da amostra. O valor do índice Shannon demonstra grande diversidade, concordando com o resultado de Simpson.

Omori (2011) relata que os estimadores ACE e Chao1 (máximo e mínimo) determinam a quantidade de OTUs na amostra tomando como base o número de sequências únicas e duplas. O número total de OTUs esperada é de aproximadamente 729 OTUs e mínimo de 478 OTUs. Em nosso trabalho pudemos constatar que o número de OTUs esperada é de 565 e mínimo de 445.

### **3.3. Metabolismo heterotrófico médio observado nas bactérias do solo**

A ideia em realizar este experimento foi obter informações acerca da capacidade dos micro-organismos em utilizar os substratos contidos na placa Biolog Ecoplate, tendo em vista que a maioria dos compostos na placa reflete o habitat ao qual estes micro-organismos pertencem. Os resultados obtidos nos surpreendeu quanto à agilidade e rapidez com que os micro-organismos utilizaram os substratos dispostos na placa, confirmando a capacidade de adaptação da microbiota. O metabolismo dos compostos carbônicos pelos microrganismos cultiváveis foi rápido,

já que o desenvolvimento de cor na placa, pela redução do tetrazólio, foi observado nas primeiras 48 horas de incubação (Figura 11).

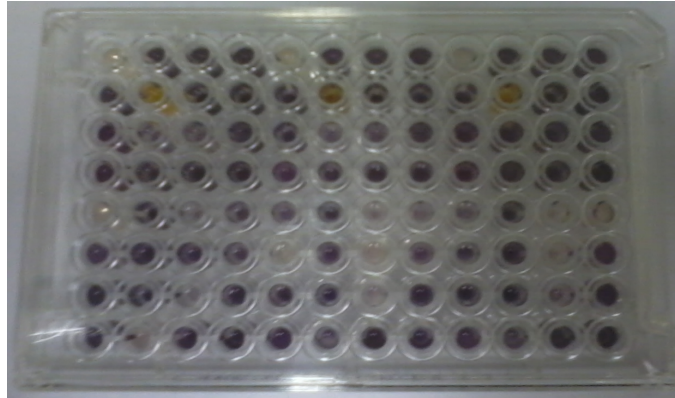


Figura 11: Ilustração do desenvolvimento de cor pela redução do tetrazólio na placa Biolog Ecoplate.

O teste de redução de tetrazólio está fundamentado na alteração da coloração de tecidos em presença da solução de sal de tetrazólio. Devido à atividade das enzimas desidrogenases, oxidoredutases associadas ao metabolismo respiratório. Esta atividade bioquímica está relacionada ao ciclo do carbono (fixação de C), o que registra ainda mais a importância da matéria orgânica disposta no solo e também está associada ao metabolismo de ácidos carboxílicos, que incluem reações para degradação de compostos aromáticos, dentre os quais alguns xenobióticos. Com a atividade respiratória houve a liberação de íons hidrogênio com os quais o sal de tetrazólio, incolor e solúvel, reagiu com os tecidos vivos formando uma substância de cor vermelha e insolúvel denominada formazan (DELOUCHE et al., 1976). Os sais indicaram a reação de oxidação-redução que ocorreu nas células, sendo observada a coloração na placa.

De acordo com Zak e colaboradores, que foram uns dos cientistas que propuseram a utilização de placas Biolog Ecoplate em 1994, a diversidade metabólica é definida pelo número, tipo e taxa de utilização de um conjunto de substratos pela comunidade microbiana, que é consequência da diversidade genética, dos efeitos ambientais na expressão gênica e das interações ecológicas

entre as diferentes populações. A utilização dos substratos pela atividade respiratória microbiana foi verificada com a utilização deste método de coloração.

### 3.4. Diversidade metabólica da comunidade (*Community Metabolic Diversity – CMD*)

A CMD é representada pelo número de substratos utilizados pela comunidade microbiana. Nos períodos de incubação entre 48-120 h detectamos crescente atividade metabólica, com intensa utilização das fontes de C pela comunidade microbiana principalmente nas 72 h (Figura 12). Esta observação foi registrada em função da densidade óptica quando a coloração púrpura foi detectada, resultado do metabolismo respiratório heterotrófico dos micro-organismos. Esta cinética demonstra um solo com atividade fisiológica dinâmica, com intensa atividade respiratória da comunidade microbiana. A intensidade da atividade respiratória nesta comunidade parece estar se estabilizando no período entre 96-120 h, quando começa haver uniformidade na degradação dos compostos carbônicos.

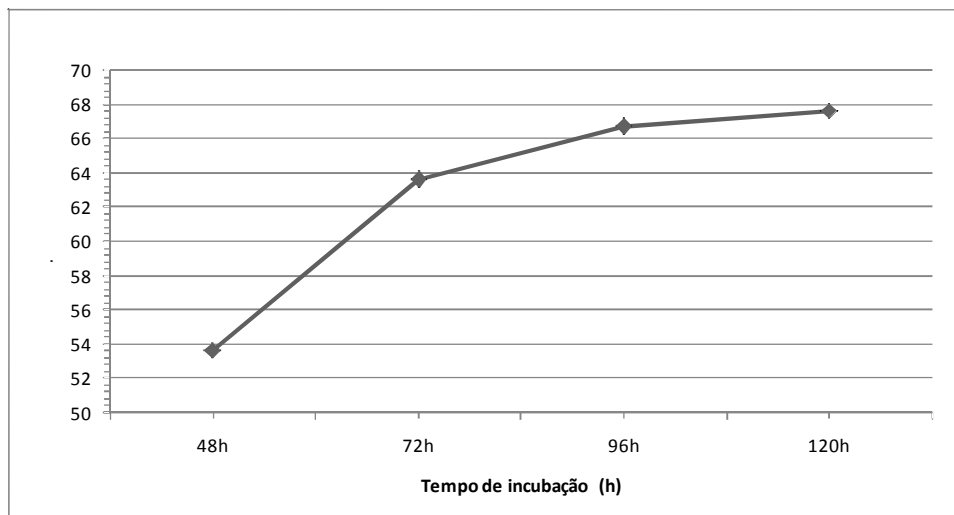


Figura 12: Cinética do metabolismo dos micro-organismos por fontes de carbono em Biolog Ecoplate evidenciando a riqueza funcional da comunidade microbiana (“average metabolic response” – AMR), durante redução de tetrazólio em relação ao tempo de incubação da comunidade microbiana de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

Comunidades procarióticas podem ser consideradas unidades funcionais caracterizadas pela soma das propriedades metabólicas individuais. A ferramenta Biolog Ecoplate se tornou indicativa do perfil fisiológico em nível de comunidade microbiana uma vez que agrega 31 das principais fontes de carbono para comunidades presentes em solos (PRESTON-MAFHAM et al., 2002; STEFANOWICZ, 2006). Ela está relacionada à técnica denominada Perfil Fisiológico em Nível de Comunidade (*Community Level Physiological Profiling* – CLPP) (KONOPKA et al., 1998; STEFANOWICZ, 2006).

### **3.5. Média da resposta metabólica (*Average Metabolic Response* – AMR)**

A AMR descreve a média de respiração pela redução de tetrazólio na utilização das fontes de carbono pela comunidade microbiana conforme a AWCD (*average well color development*) da placa toda, ou seja, de todos os grupos carbônicos. A diversidade funcional microbiana (Figura 13) é observada pelo índice de desenvolvimento de cor em relação ao tempo de incubação.

Os valores AWCD aumentam rapidamente entre 48 e 72 h, assumindo depois um perfil de estabilização condizente com o grau de consumo do substrato. O metabolismo não pode diferir quanto à forma de calcular a atividade respiratória, apenas confirma a redução de tetrazólio pela coloração observada (D.O) e a intensidade de cor (AWCD) representada na placa toda (STEFANOWICZ, 2006).



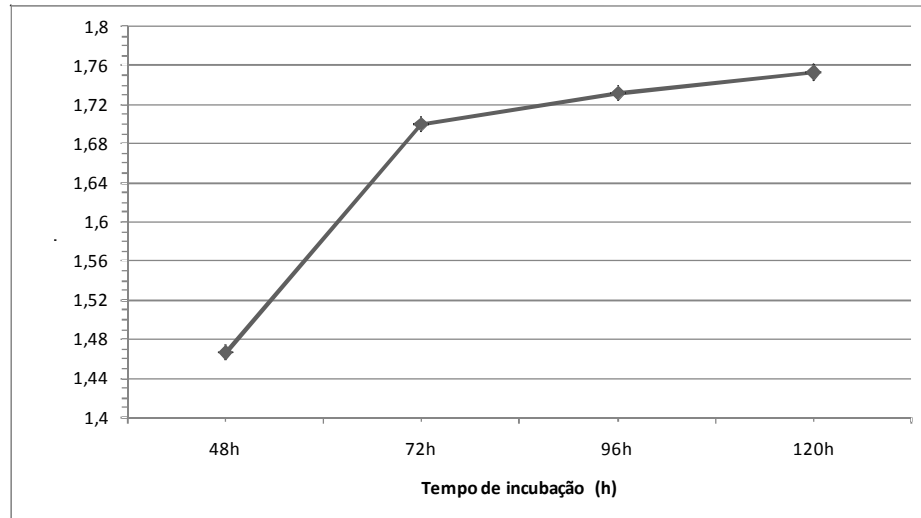


Figura 13: Média da resposta metabólica em relação ao tempo de incubação em função da média do desenvolvimento de cor na microplaca Biolog Ecoplate (“avegare well color development” – AWCD) da análise do perfil fisiológico da comunidade microbiana (CLPP) de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

A diversidade microbiana neste ambiente além de ser capaz de obter todos os substratos presentes na placa como fonte de energia, nos mostrou que todos foram totalmente metabolizados como indica a média da atividade respiratória observada na placa toda, indicativo de uma ampla diversidade funcional.

### **3.6. Cinética metabólica observada pela utilização de carbono nos diferentes substratos**

Considerando que a coloração púrpura observada ocorre quando os microorganismos utilizam as fontes de carbono e inicia a respiração, a cinética mostra o potencial de emissão de  $\text{CO}_2$  pela comunidade microbiana em solo sob ação antropogênica; fato este que pode estar associado à emissão de gases de efeito estufa associado à cultura da cana-de-açúcar (CERRI et al., 2004).

A fim de avaliar diferenças na rapidez com que houve a utilização dos substratos de forma detalhada, os grupos de carbono foram classificados conforme o tempo de metabolismo dos mesmos (Figura 14).

O tamanho da população inicial e a taxa específica de crescimento em função de cada substrato representam uma combinação da fase de adaptação da amostra à cultura contida na microplaca.

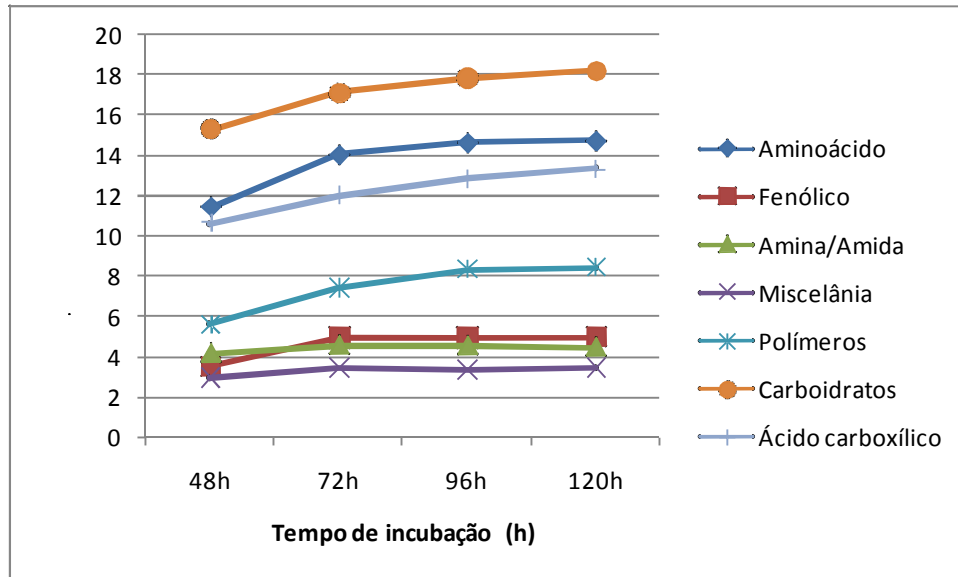


Figura 14: Somatória das médias de densidade óptica dos grupos carbônicos degradados pela microbiota em relação ao tempo de incubação da placa.

Os substratos cuja rapidez de metabolização se destaca foram os carboidratos, aminoácidos e ácidos carboxílicos. A preferência por compostos químicos de cadeia carbônica menos complexa foi evidente, devido à disposição dos C mais facilmente para obtenção de energia. Os micro-organismos heterotróficos com base nos padrões de utilização de substratos apresentaram alto nível de degradação de todos os compostos, contudo, é interessante a avaliação de quais fontes de C foram prontamente degradadas e quais o tempo de incubação foi maior para que fosse detectada atividade respiratória intensa.

Dos 31 substratos aplicáveis ambientalmente na microplaca Biolog Ecoplate, nove são considerados constituintes de exudatos radiculares. Todos os compostos presentes são de relevância ecológica e detectam organismos usualmente ausentes quando prospectados por métodos seletivos para espécies de rápido crescimento (PRESTON-MAFHAM et al., 2002).

A microplaca dispõe de oito tipos de diferentes carboidratos (D-celobiose,  $\beta$ -metil-D-glicosídeo, N-acetil-D-glicosamina, i-Eritritol, D-xilose, Ácido D-galacturônico  $\gamma$ -lactona,  $\alpha$ -D-lactose, D-manitol), sete de ácido carboxílico (Ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico, Ácido D-glicosamínico, Éster metílico do ácido pirúvico, Ácido Itacônico, Ácido D-galacturônico, Ácido  $\alpha$ -cetobutírico, Ácido D-málico) e seis aminoácidos (L-serina, L-fenilalanina, L-arginina, L-treonina, L-asparagina, Ácido glicil-L-glutâmico), os quais

foram os três grupos de compostos onde se observou alta atividade respiratória em relação aos outros compostos de C.

Dentre os carboidratos, três foram prontamente metabolizados pela comunidade microbiana, sendo estes o D-manitol, D-celobiose seguido de N-acetil-D-glicosamina como ilustra a figura 15.

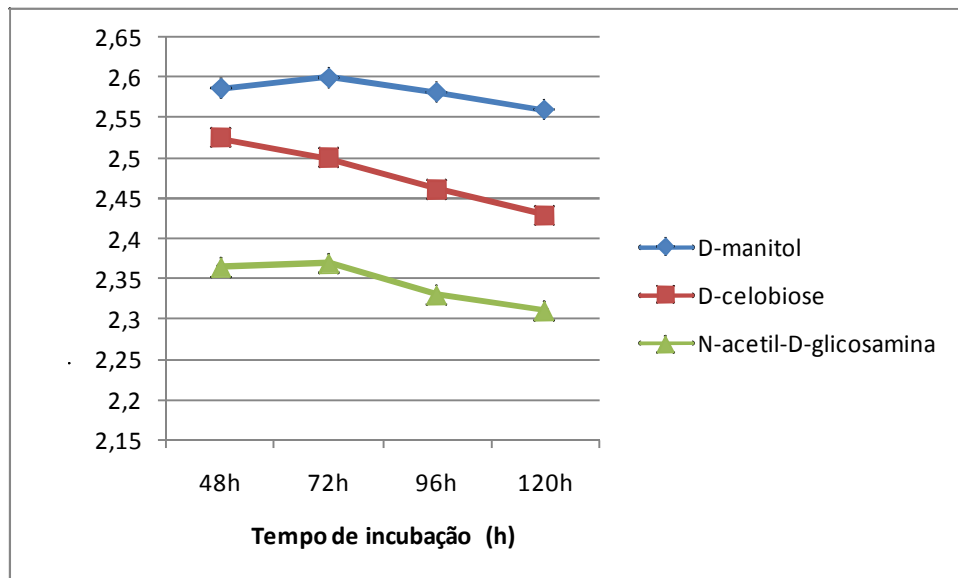


Figura 15: Carboidratos prontamente degradados em função da densidade óptica em relação ao tempo de incubação da placa Biolog Ecoplate.

Dentre o grupo de carboidratos, destacamos o composto D-celobiose, tendo em vista que este faz parte do complexo da matriz energética celulósica, de interesse para a produção de biocombustível. A densidade óptica observada foi alta desde as primeiras 48 h de incubação dos microrganismos da placa, e nas horas seguintes houve uma queda, sendo evidenciada a rapidez com que foi degradado prontamente pela microbiota presente na placa. A degradação por compostos carbônicos simples é evidente, tendo em vista que a celobiose é um dissacarídeo de fórmula  $[\text{HOCH}_2\text{CHO}(\text{CHOH})_3]_2\text{O}$  conforme a estrutura ilustrada na figura 16. A celobiose parece interagir com proteínas do complexo celulósico, fornecendo um importante papel nesta enigmática enzima, já que está intimamente ligada às moléculas de glicose (DAVID, 2012).

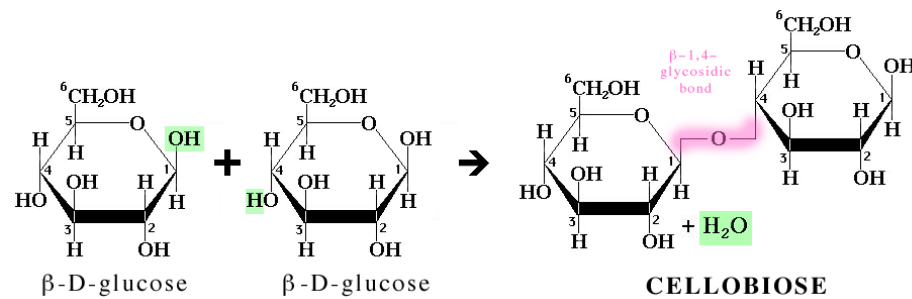


Figura 16: Estrutura química da celobiose, composta por duas moléculas de glicose unidas por ligação  $\beta(1\rightarrow4)$  e resulta da hidrólise parcial da celulose.

A matéria orgânica disposta no solo agregada ao potencial energético da palhada sobre o mesmo, potencializa a ação de enzimas que trabalham favorecendo a decomposição do complexo celulolítico presente na parede celular da cana-de-açúcar, fornecendo glicose à comunidade microbiana. Tendo em vista a relevância da metabolização de complexos energéticos como a celulose, é interessante analisarmos a composição química da palhada como disposto nas análises posteriores.

As celulasas são enzimas chave usadas em muitos processos para produção de combustível líquido originado de biomassa. Este complexo multienzimático das celulasas vem sendo estudado desde início de 1940 com ênfase na indústria biotecnológica, tendo em vista o crescente interesse mundial para aplicação de combustíveis de fonte alternativa como foi revisado neste trabalho. De fato, sabe-se que o desafio em desestruturar a recalcitrante parede celular dos vegetais, é grande. Uma vez, que encontramos alta atividade metabólica da comunidade microbiana por um açúcar que é desencadeado pela quebra da molécula de celulose, fica claro o potencial que encontramos no solo sob cultivo de cana-de-açúcar estudado.

Um dos principais autores que descreve a complexidade deste curioso universo enzimático foi LEE LYND et al. (2002), que deixa evidente a dificuldade de quebra da estrutura celulósica até atingir a molécula tão energética que é a glicose, chave na obtenção máxima de energia para aplicação industrial em se tratando de etanol de segunda geração. É fato, que no grupo de bactérias, cultivadas e utilizadas para explorar o potencial enzimático da comunidade microbiana do solo, está presente algumas que possuem atividade envolvida na degradação da celulose.

Apesar de ser apenas uma evidência, pode-se concluir que tem-se material potencial para ser explorado em termos de riqueza enzimática sendo que os resultados indicaram a presença destas enzimas pela atividade metabólica na placa Ecoplate.

Um dos papéis destes microrganismos no solo está no envolvimento do ciclo do carbono, assunto em evidência no Brasil e no mundo pela preocupação com o aquecimento global e emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera. A discussão durante a conferência em Copenhague em 2009 mostrou clara a preocupação para o estado climático do mundo. No periódico Nature, três meses antes da reunião na Dinamarca, já deixava argüido por Johan Rockstrom e colaboradores os limites dos recursos em nosso planeta.

A preocupação com os fatores que poderiam influenciar a perda da biodiversidade e os impactos na humanidade gerou importantes discussões desde 1980, destaque para os maiores decompositores de matéria orgânica e conseqüente ciclagem de nutrientes na Terra que são os microrganismos (CARDINALE et al., 2012).

O grupo de substratos de carbono dos ácidos carboxílicos, os de maior densidade ótica foram o Ácido-D-glicosamínico, o Éster Metílico do ácido pirúvico e por último o ácido-D-málico (Figura 17).

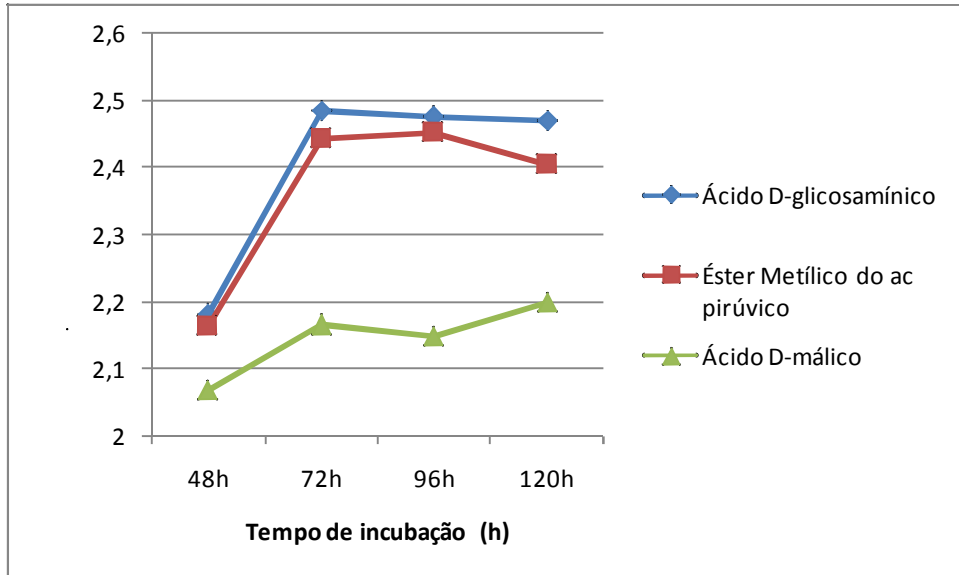


Figura 17: Ácidos carboxílicos de maior atividade de degradação em função da densidade ótica em relação ao tempo de incubação da placa Biolog Ecoplate.

Dos ácidos carboxílicos destacamos o ácido málico de formulação química  $C_4H_6O_5$  (Figura 18), de interesse ambiental. Houve atividade metabólica crescente nas primeiras 48 h – 72 h de incubação pela microbiota bacteriana presente na placa Ecoplate.

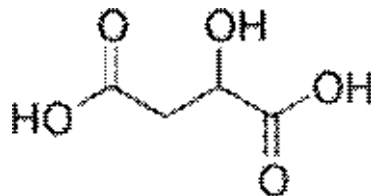


Figura 18: Estrutura química do ácido málico.

Apesar de não ser o composto com maior atividade metabólica dentre os apresentados no grupo dos ácidos carboxílicos, destacamos o ácido málico por se enquadrar no amplo aspecto dos ciclos biogeoquímicos. O malato ( $O-OC-CH_2-CH(OH)-COO^-$ ) é a forma ionizada do ácido málico e no processo de fixação do carbono pela via  $C_4$ , o malato representa a fonte de  $CO_2$  no ciclo de Calvin. A fixação do carbono como mencionado é fundamental para minimizar efeito estufa, vindo ao encontro também com a preocupação na redução de área para plantio de

cana-de-açúcar, que sendo esta produzida para a produção de etanol de primeira e segunda geração, reduz efeitos prejudiciais ao meio ambiente.

Dentre os aminoácidos presentes na placa, os que apresentaram maior valor de densidade óptica foram: L-serina, L-asparagina e L-fenilalanina (Figura 19).

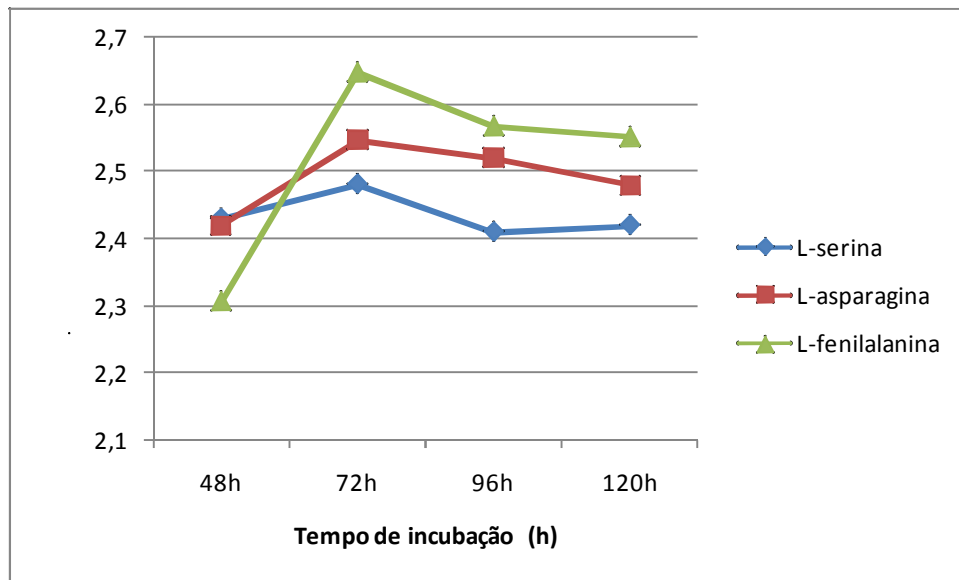


Figura 19: Aminoácidos de maior atividade de degradação em função da densidade óptica em relação ao tempo de incubação da placa Biolog Ecoplate.

O aminoácido fenilalanina merece destaque, pois além de apresentar um pico de atividade na placa principalmente das 48 h até 72 h de incubação, também atua na biorremediação. A presença de bactérias que apresentam atividade metabólica por composto como a fenilalanina é um indicativo do potencial para a biorremediação em ambientes com excesso de metais, uma vez que a fenilalanina é destaque em solos considerados ultramáficos, ou seja, participa da correção do solo, contribuindo para a produção de energia. A fórmula química da fenilalanina é  $C_9H_{11}NO_2$  como ilustrado em sua estrutura (Figura 20).

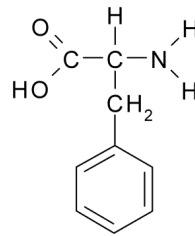


Figura 20: Estrutura química do aminoácido fenilalanina.

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, e se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO, 2007). Dos compostos fenólicos secundários em plantas, a classe de maior abundância é derivada da fenilalanina, com atuação da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), onde há eliminação da molécula de amônia formando assim o ácido cinâmico. A FAL está localizada em um ponto específico de ramificação entre os metabolismos primários e secundários, sendo que sua reação catalítica é uma etapa regulatória essencial na formação de compostos fenólicos (TAIZ, 2004).

Enzimas microbianas que conferem resistência a metais têm importância biotecnológica e ambiental a partir de seus usos potenciais em processos de biorremediação. Diante disso, há 3 anos atrás, liderado pela Embrapa Cerrados, a abordagem metagenômica em busca de novos biocatalisadores com ênfase em biorremediação, foi proposta no projeto intitulado “Diversidade e Prospecção de Genes Bacterianos Envolvidos com Tolerância a Níquel na Rizosfera de Plantas Adaptadas a Solos Ultramáficos”.

A utilização dos compostos disponíveis nas microplacas é apenas um indicativo da riqueza da comunidade microbiana, pois, a metodologia reflete a diversidade metabólica potencial e não aquela existente *in situ* (GARLAND e MILLS, 1991). O tempo de incubação pode ser um fator limitante para populações pouco abundantes, indicando falsos negativos. Contudo, apesar das limitações o método Biolog pode revelar diferenças consideráveis nos padrões de utilização de substratos de C pelas comunidades microbianas (ZAK et al., 1994; GRAHAM e HAYNES, 2005).

Cada poço da microplaca torna-se um indicativo de cultura enriquecida representada por espécies bacterianas dominantes, ou ainda um membro



minoritário, mas de rápido crescimento. A avaliação do perfil da comunidade microbiana se estendeu neste trabalho à análise molecular para caracterizar procariotos incultiváveis, agregando resultados da atividade bioquímica. Como por exemplo, o fato de que o solo tinha cobertura de palhada o que contribuiu e contribui com a matéria orgânica, atividades microbianas associadas a celobiose, dentre outras.

### **3.7. Metagenoma dos micro-organismos do solo por sequenciamento de nova geração (Illumina®)**

Das sequências geradas no Illumina, oriundas do DNA total extraído dos micro-organismos do solo, 120 mil foram usadas para uma análise parcial (o que corresponde a 0,18% do total de sequências da amostra), sendo estas, submetidas ao software WebCARMA (GERLACH et al., 2009).

Os resultados apontaram os domínios presentes na amostra de solo (Figura 21), apesar de haver predominância de sequências desconhecidas. A Figura 22 apresenta dados dos filos presentes na amostra, onde a prevalência foi de *Proteobacteria* e *Acidobacteria*.

As classes (Figura 23) de maior representatividade foram *Actinobacteria* e *Deltaproteobacteria*, a Ordem representada na Figura 24 predominam *Actinomycetales* e *Planctomycetales*.

As famílias (Figura 25) de maior abundância foram *Bradyrhizobiaceae* e *Streptomycetaceae*, os gêneros (Figura 26) em destaque foram *Bradyrhizobium* e *Streptomyces* e as espécies predominantes foram *Bacillus megaterium*, *Candidatus Solibacter ursitatus* e *Bradyrhizobium japonicum* (Figura 27).

A alta predominância de sequências “desconhecidas” indica o quanto ainda é escasso nosso conhecimento sobre o rico ambiente que é o solo. É fato que a comunidade científica se sente instigada a continuar a investigação, tendo em vista o mundo microbiano a ser explorado e que deve ser descrito para novas descobertas de recursos enzimáticos, sistemas metabólicos diversos como fármacos, enfim, é evidente a riqueza guardada que deverá em breve ser revelada. Novos micro-organismos poderão ser descritos nos bancos de dados com a

aplicação da microbiologia clássica aperfeiçoada para o cultivo de novas espécies de micro-organismos em laboratório. Podemos observar a quantidade de bactérias, seguidas pelos eucariotos e uma parcela de arqueia, evidenciando o quanto de informações a cerca da biodiversidade microbiana presente no solo foi possível estimar por meio do sequenciamento de nova geração.

Pode-se destacar a identificação da bactéria fixadora de nitrogênio presente no solo, *Bradyrhizobium japonicum*, que em simbiose com a soja, por exemplo, converte o nitrogênio atmosférico por meio do complexo nitrogenase, em amônia para a planta (Figura 27). Segundo Moreira e colaboradores em 2010, os diazotróficos compreendem ampla gama de procariotos, incluindo representantes de arqueobactérias (Figura 21), cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. A diversidade garante não só a resiliência dos processos que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste, nos mais diferentes habitats terrestres (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância agrícola, nacional e mundial, requerendo grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados e fosfatados. Dentre a diversidade de espécies identificadas (Figura 27) podemos destacar *Bacillus megaterium* como representante das bactérias solubilizadoras de fosfato. Esta bactéria solubiliza o fosfato existente no solo, disponibilizando o fósforo para as plantas. O *B. megaterium*, foi cultivado em laboratório na antiga União Soviética, e utilizado na forma de inoculante para fertilizar o solo, aumentando a solubilização de minerais fosfatados (LIRA-CADETE et al., 2012).

As espécies de relevância, destacadas são imprescindíveis aos processos de fertilização do solo e enriquecimento vegetal para a cultura de cana-de-açúcar, principalmente. Além do nitrogênio, a cana-de-açúcar requer grande quantidade dos fertilizantes fosfatados, devido às características dos solos em que são cultivadas (SIMÕES NETO et al., 2009). Sendo este elemento um dos mais limitantes para o desenvolvimento dos vegetais, mesmo se adicionado como fertilizante químico, pois pode se tornar rapidamente indisponível, principalmente em solos mais intemperizados (LIRA-CADETE et al., 2012).

O filo *Proteobacteria* é predominante no solo, como já discutido no sequenciamento por meio do método Sanger, e vem confirmar por meio do Illumina a prevalência deste grupo (Figura 22). É comprobatório o envolvimento de um dos maiores grupos taxonômicos descritos como os principais no que se refere aos ciclos biogeoquímicos na natureza, sendo um deles o carbono. Este grupo por ser o mais abundante, é possível que esteja diretamente envolvido ao processo de obtenção de glicose da parede celular vegetal. Tendo em vista a ligação das *Proteobacteria* à utilização de energia por meio do complexo celulósico mantido na parede celular da cana-de-açúcar, são de alguma forma de grande interesse para a produção de etanol de segunda geração.

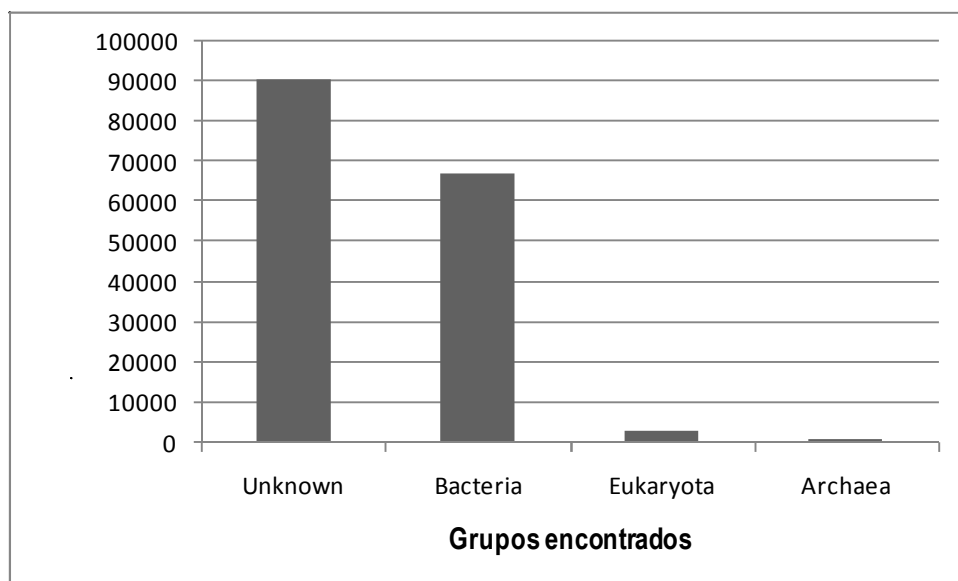


Figura 21: Sequências do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, sendo que 120 mil foram analisadas e confrontadas com sequências dos micro-organismos descritos nos Bancos de dados.

Com o método WGS pela plataforma Illumina, foi possível acessar a composição total da comunidade microbiana, tanto bactérias quanto eucariotos e arqueias. As arqueias e eucariotos apresentaram pouca representatividade em relação às bactérias, grupo de maior abundância. Não se pode deixar de destacar que muitos micro-organismos não puderam ser identificados e classificados, pois a descrição microbiana é limitada nos bancos de dados, o que deverá sofrer um avanço nos próximos anos a fim de incluir estas sequências “desconhecidas”,

ampliando e possivelmente alterando a classificação atual. Isso será possível empregando as técnicas microbiológicas clássicas para isolamento destes microorganismos agregadas a identificação molecular.

A análise por WGA por sequenciamento Sanger destaca as bactérias, mas também mostra o quanto ainda faltam para caracterizá-las. O método mostrou abundância dos procaríotos ainda não descritos nos bancos de dados como pelo WGS. O método WGS aprofundou melhor a classificação e nos permitiu relacionar os grupos de maior e menor presença no solo com mais propriedade. Ambos os métodos, tanto de WGS quanto de WGA deixam evidentes que pouco se conhece sobre o mundo microbiano disposto no solo.

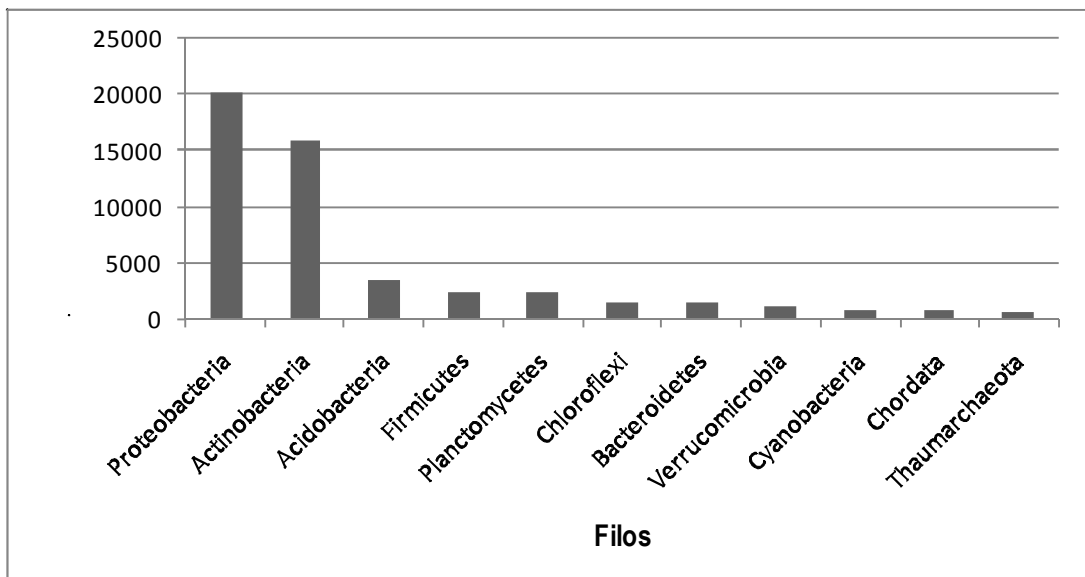


Figura 22: Número de sequências do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequências dos Filos descritos nas bases de dados.

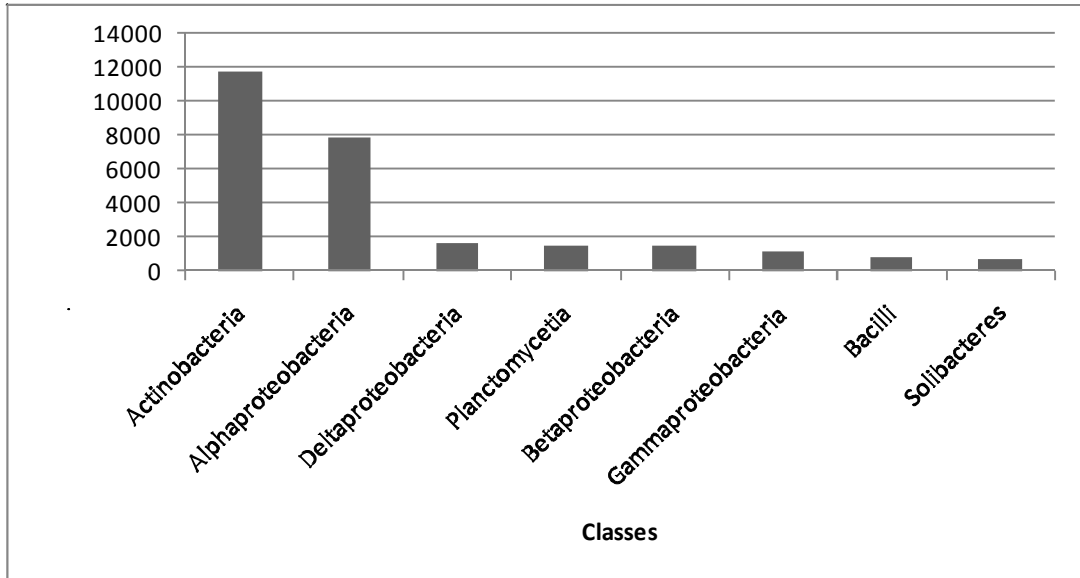


Figura 23: Número de sequências do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequências das Classes descritas nas bases de dados.

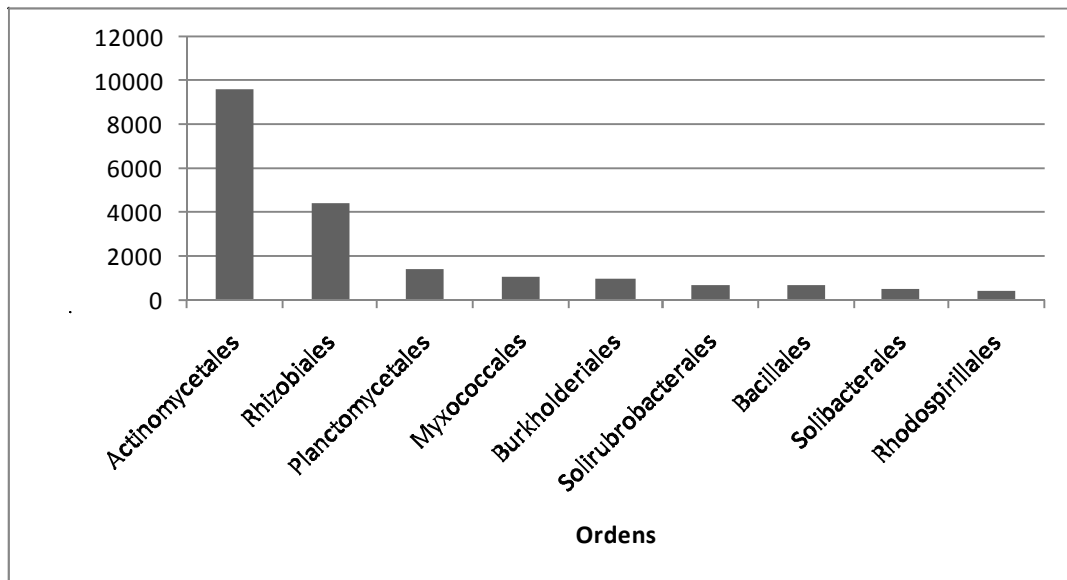


Figura 24: Número de sequências do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequências de Ordens descritas nas bases de dados.

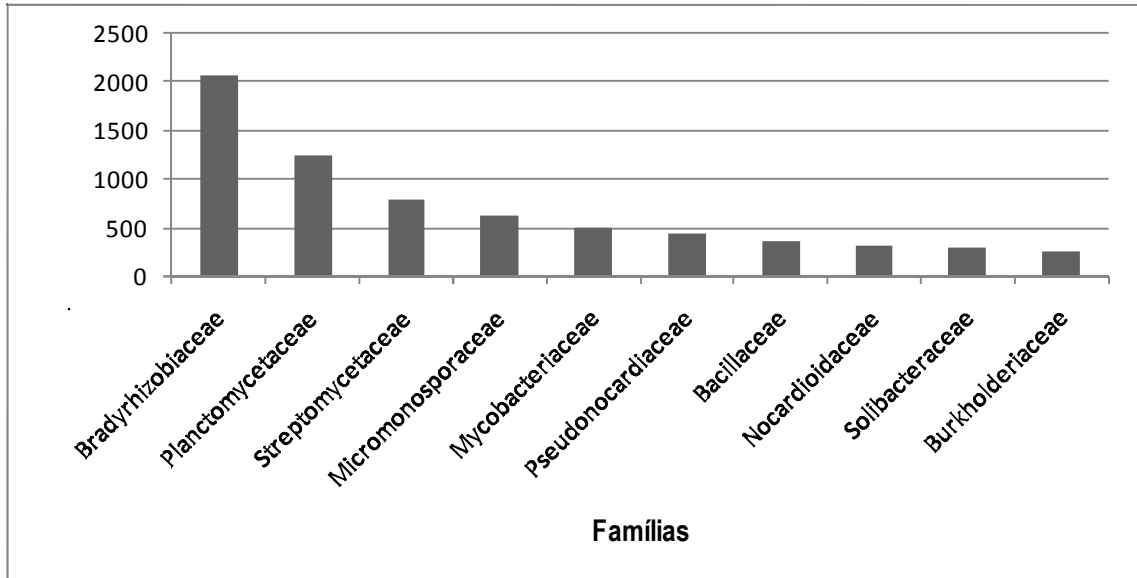


Figura 25: Número de sequências do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequências das Famílias descritas nas bases de dados.

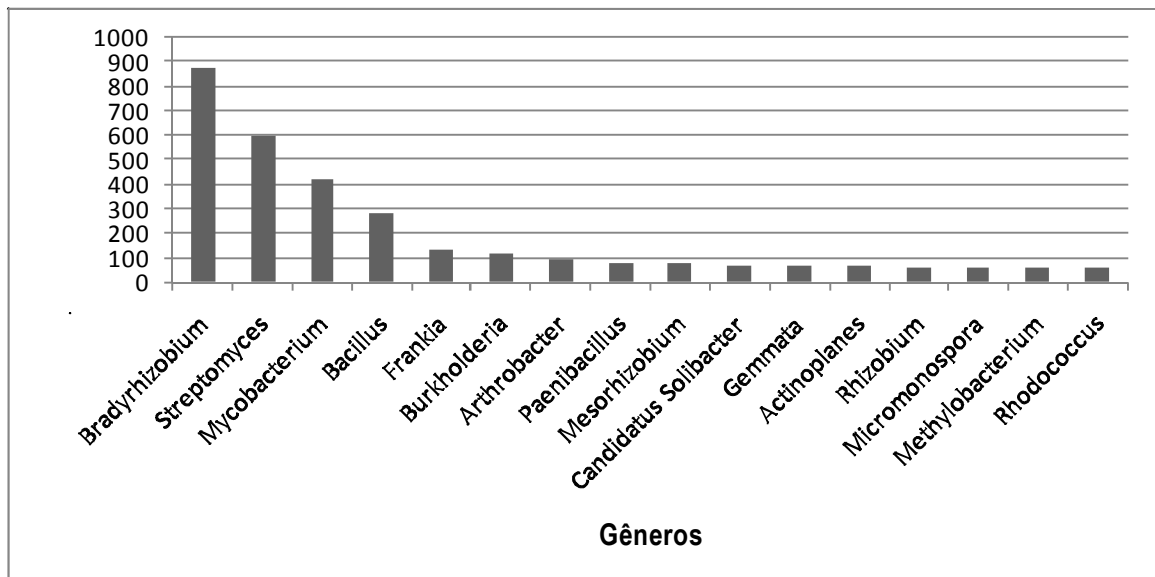


Figura 26: Número de sequências do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequências de Gêneros descritos nas bases de dados.

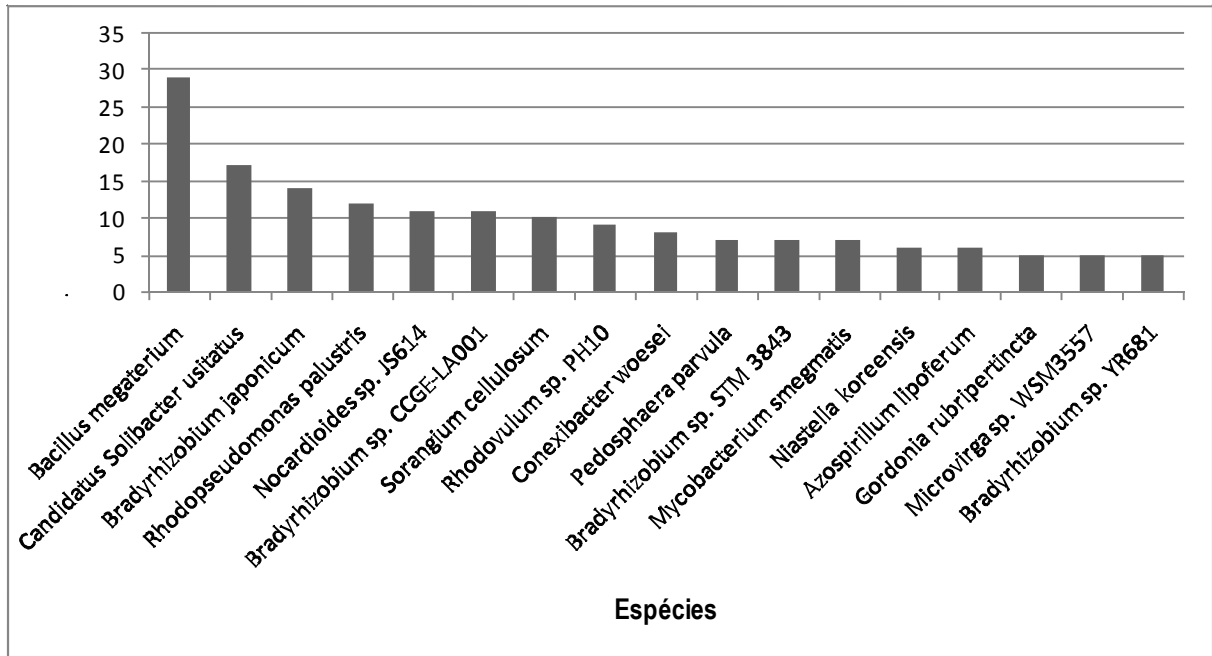


Figura 27: Número de sequências do DNA metagenômico da microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar, em relação às sequências das Espécies descritas nas bases de dados.

O fator determinante desta parte do trabalho é a presença da palhada sobre o solo, o que favorece e potencializa a ação da microbiota na abundante matéria orgânica disposta em que, sendo esta metabolizada, permite a ciclagem de nutrientes o que contribui para com o equilíbrio ecológico ambiental.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os dados hipotéticos gerados pelo seqüenciador Illumina abrem perspectivas na microbiologia clássica em identificar novos micro-organismos e com isso alimentar os Bancos de dados mundiais.

A habilidade dos micro-organismos degradarem compostos carbônicos simples e complexos mostrou-nos o potencial enzimático da microbiota para a aplicação em bioenergia utilizando a própria cana-de-açúcar.



## 5. REFERÊNCIAS

BALSER, T.C.; KINZIG, A.P.; FIRESTONE, M.K. Linking soil microbial communities and ecosystem functioning. In: KINZING, A.P.; PACALA, S.W.; TILMAN, D. (Ed.). *The functional consequences of biodiversity: empirical progress and theoretical extensions*. Princeton University, p. 265-293, 2002.

BLOEM, J.; BENEDETTI, A.; HOPKINS, D. *Microbial methods assessing soil quality*. CABI Publishing, CAB International, Wallingford Oxford-shire, UK, ISBN 0-85199-098-3, 2006.

Cardinale, B. et al. Biodiversity loss and its impact on humanity. **Nature**, v. 486, 2012.

CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P.; DAVIDSON, E.A.; BERNOUX, M.; FELLER, C. A ciência do solo e o sequestro de carbono. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3, p. 29-34, 2004.

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

CHAO, A.; LEE, S. M. Estimating the number of classes of via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, v. 87, n. 417, p. 210-217, 1992.

CHAO, A.; MA, M.C.; YANG, M.C.K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. **Biometrika**, v. 80, n. 1, p. 193-201, 1993.

DELMONT, T.O.; ROBE, P.; CECILLON, S.; CLARCK, I.A.; CONSTANCIAS, F.; SIMONET, P.; HIRSCH, P.R.; VOGEL, T.M. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, p. 135-1324, 2011.

DELOUCHE, J.C. Standardization of vigor tests. **J. Seed Technol**, v. 1, n. 2, p. 75-85, 1976.

DEMANECHE, S. et al. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, p. 3957-3962, 2008.

ELSAS, J.D. van; GARBEVA, P.; SALLES, J. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. **Biodegradation**, v. 13, p. 29-40, 2002.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of aOTUated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of aOTUated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FAORO, H. **Determinação da biodiversidade de Bacteria e Archaea da Mata Atlântica paranaense**. Curitiba: Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2006, 171f.

FAORO, H.; ALVES, A.C.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; CRUZ, L.M.; AL-JANABI, S.M.; MONTEIRO, R.A.; BAURA, V.A.; PEDROSA, F.O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the southern Brazilian Atlantic forest. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, p. 4744-4749, 2010.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, p. 626-631, 2006.

FIERER, N.; STRICKLAND, M.S.; LIPTZIN, D.; BRADFORD, M.A.; CLEVELAND, C.C. Global patterns in belowground communities. **Ecology Letters**, v. 12, p. 1238-1249, 2009.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns on community-level, sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GORDON, D. Viewing and editing assembled sequences using Consed. **Current Protocols in Bioinformatics**, A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds, New York: John Wiley & Co., p. 11.2.1-11.2.43, 2004.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORDON, D.; DESMARAIS, C.; GREEN, P. AOTUated finishing with aOTUfinish. **Genome Research**, v. 11, n. 4, p. 614-625, 2001.

GOVAERTS, B.; MEZZALAMA, M.; UNNO, Y.; SAYRE, K.D.; LUNA-GUIDO, M.; VANHERCK, K.; DENDOOVEN, L.; DECKERS, J. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 37, p. 18-30, 2007.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 155-164, 2005.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 1719-1728, 2006.

KEMMITT, S.J.; WRIGHT, D.; GOULDING, K.W.T.; JONES, D.L. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. **Soil Biol Biochem**, v. 38, p. 898-911, 2006.

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S,

Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). **The Prokaryotes**, v. 5, Springer: New York, p. 3-37, 2006.

KNIETCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; ROLF, D. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 5, p. 46-56, 2003.

KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO, R.F, Jr. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 103-115, 1998.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. v. 4, p. 43-84, 2005.

LIRA-CADETE, L. et al. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Biosci. J. Uberlândia**, v. 28, supplement 1, p. 122-129, 2012.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H. & PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton University Press, Princeton, p. 1-179, 1998.

MORAIS, M. **Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar**. Tese. Piracicaba, 2008. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NOBREGA, A. R.S.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2ª ed., p. 729, 2006.

NUNES, R. de S.; LOPES, A.A. de C.; SOUSA, D.M.G. de; MENDES, I. de C. Sistemas de manejo e os estoques de carbono e nitrogênio em latossolo de cerrado com a sucessão soja-milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1407-1419, 2011.

PEIXOTO, R.S.; CHAER, G.M.; FRANCO, N.; REIS JUNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; ROSADO, A.S. A decade of land use contributes to change in the chemistry, biochemistry and bacterial community structure of soils in the Cerrado. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 98, p. 403-413, 2010.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

PRESTON-MAFHAM, J.; BODDY, L.; RANDRESON, P.F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 1-14, 2002.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for diverse applications. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 576-590, 2008.

REBER, H. H. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 13, p. 181-186, 1992.

ROCKSTROM, J. et al. A safe operating space for humanity. **Nature**, p. 661, 2009.

ROESCH, L.L. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J**, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROLF, R. The metagenomics of soil. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 470-478, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. v. 3, 2001.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR. A computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Curr Opin Biotechnol**, v. 14, p. 303-310, 2003.

SIMÕES NETO, D. E.; OLIVEIRA, A. C.; FREIRE, F. J.; FREIRE, M. B. G. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; ROCHA, A. T. Extração de fósforo em solos cultivados com cana-de-açúcar e suas relações com a capacidade tampão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, p. 840-848 (Suplemento), jun, 2009.

- SIMON, C.; ROLF, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, p. 1153-1161, 2011.
- SOUZA, L.M.; SCHLEMMER, F.; ALENCAR, P.M.; LOPES, A.A.C.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; FERNANDES, M.F.; MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B. Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, p. 269-276, 2012.
- SPAIN, A.M.; KRUMHOLZ, L.R.; ESLHAHED, M.S. Abundance, composition, diversity and novelty of Proteobacteria. **ISME J**, v. 3, p. 992-1000, 2009.
- STEFANOWICZ, A. The Biolog Plates Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial Communities. **Polish J. of Environ. Stud**, v. 15, p. 669-676, 2006.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3º ed., p. 719, 2004.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, p. 240-245, 2002.
- VAL-MORAES, S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, L. M. C. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 1, p. 7-16, 2009.
- VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. **Modern soil microbiology II**. CRC Press, Boca Raton, FL, 2006.
- VIEIRA, G. A.; CASTILHOS, D. D.; CASTILHOS, R. M. V. AtribOTUs do solo e crescimento do milho decorrentes da adição de lodo anaeróbio da estação de tratamento de efluentes da parboilização do arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 535-542, 2011.
- WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WAWRIK, B.; KUTLIEV, D.; ABDIVASIEVNA, U.A.; KUKOR, J.J.; ZYLSTRA, G.J.; KERKHOF, L. Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 2982-2989, 2007.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**, v. 173, p. 697, 1991.

WILSON, D-B. Processive and nonprocessive cellulases for biofuel production – lessons from bacterial genomes and structural analysis. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 93, p. 497-502, 2012.

ZAK, J.C.; WILLING, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biol. Biochem**, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

### **CAPÍTULO 3 – PROSPECÇÃO DE GENES FUNCIONAIS COM PERSPECTIVAS NA PRODUÇÃO DE BIOENERGIA**

**RESUMO** - A comunidade microbiana presente no solo sob ação antropogênica representa um rico ambiente a ser explorado. O potencial enzimático engloba genes como as celulases que atuam na desconstrução do arcabouço celulósico da parede celular da cana-de-açúcar disponibilizando glicose podendo ser aplicada na produção de etanol de segunda geração. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial funcional e biotecnológico da comunidade microbiana por meio da metagenômica WGS. A biblioteca metagenômica construída possui pouco mais de 17 mil clones, sendo identificados 3 clones com atividade hidrolítica em meio contendo carboximetilcelulose como única fonte de carbono. A análise da estrutura química da palhada confirmou a importância da mesma na permanência do solo, contendo alto teor de carbono, influenciando o sequestro de carbono pela microbiota do solo. A análise por meio da plataforma Illumina possibilitou identificar diversas categorias funcionais presentes nas sequências de DNA metagenômico dos microrganismos do solo sob cultivo de cana-de-açúcar. Foram identificados diversos genes dentre eles várias *ATP binding*, hidrolases, oxidoreduases e outros tabelados no material suplementar deste trabalho. Os resultados foram promissores e abrem novas perspectivas para ampliar os estudos na elucidação dos grupos funcionais identificados.

**Palavras-chave:** celulase, Illumina, biblioteca metagenômica, prospecção.

### **CHAPTER 3 - PROSPECTION OF FUNCTIONAL GENES WITH PERSPECTIVES ON BIOENERGY PRODUCTION**

**ABSTRACT** - The microbial community in the soil under anthropogenic represents a rich environment to be explored. The enzymatic potential involves genes that act as cellulases in deconstructing the framework cellulosic cell wall of sugar cane delivering glucose can be applied in the production of second generation ethanol. The aim of this study was to evaluate the functional and biotechnological potential of the microbial community by metagenomic WGS. The metagenomic library constructed have little over 17 thousand clones, three clones were identified with hydrolytic activity in media containing carboxymethyl cellulose as the sole carbon source. The analysis of the chemical structure of stubble confirmed the importance of staying in the same soil, containing high-carbon, and influencing carbon sequestration by soil microbes. The analysis by Illumina platform highlighted several functional categories present in the metagenomic DNA sequences of microorganisms in the soil under cultivation of cane sugar. We identified several genes among them several ATP binding, hydrolases, oxidoreductases and other supplementary material tabulated in this work. The results are promising and open new perspectives for larger studies to elucidate the functional groups identified.

**Keywords:** cellulase, Illumina metagenomic library, bioprospection.



## 1. INTRODUÇÃO

Sequências metagenômicas oriundas dos micro-organismos do solo, os quais 99,9% são incultiváveis, estão apontando como uma nova ferramenta de exploração ao potencial biotecnológico oculto no solo aumentando nosso conhecimento sobre a ecologia e fisiologia dos micro-organismos. Compreender a complexidade das comunidades microbianas e como os micro-organismos interagem representa um grande desafio para os microbiologistas (STREIT & SCHMITZ, 2004).

Novos biocatalisadores e metabólitos têm sido obtidos em bibliotecas metagenômicas. Um passo essencial no processo de análise da metagenoma é o rastreamento de clones que contêm os genes específicos entre um grande número que constitui uma biblioteca metagenômica. Basicamente existem duas aplicações para a detecção de genes nos clones de uma biblioteca metagenômica, sendo por meio de atividade funcional e por análise de sequências (COWAN et al., 2005).

O acesso a enzimas celulolíticas tem sido realizado com a aplicação metagenômica tanto por rastreamento funcional utilizando substratos específicos, como carboximetilcelulose, na busca dos genes envolvidos no sistema mutienzimático das celulasas como também por análise das sequências de DNA metagenômico (GUPTA & LEE, 2008). A busca por enzimas com potencial biotecnológico tem sido o principal alvo nas pesquisas para a otimização no processo de produção do etanol de segunda geração, reduzindo custos e aproveitando ao máximo a energia contida na parede celular da cana-de-açúcar. A aplicação metagenômica é bastante útil no rastreamento de clones contendo genes específicos (PARK et al., 2008).

A ciência metagenômica em contraste com genomas individuais de micro-organismos apresenta desafios em sua complexidade pela existência do universo microbiano desconhecido e ferramentas para análises. Recentemente, metaestratégias têm emergido com respeito a essa questão, como o desenvolvimento da nova geração de seqüenciadores Illumina que aumenta a capacidade de seqüenciar os metadados. Esta metodologia possibilita obter resultados oriundos do DNA metagenômico da comunidade microbiana do solo conhecido como WGS, podendo inferir a classificação taxonômica e a abordagem

funcional da comunidade microbiana do solo. Numerosas ferramentas bioinformáticas estão sendo desenvolvidas para enfrentar a vasta quantidade de sequências geradas pelos novos seqüenciadores (PETROSINO, 2009).

O objetivo foi explorar a microbiota do solo sob cultivo de cana-de-açúcar por abordagem metagenômica na identificação de genes com possível potencial para a produção de etanol de segunda geração.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos (Figura 28) foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas (LBMP) sob chefia da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Universidade Estadual Paulista (Unesp) câmpus de Jaboticabal. As técnicas empregadas neste trabalho se enquadram nos padrões de biossegurança (NB-1) não conferindo riscos ao ambiente e ao ser humano.

As etapas desta parte do trabalho estão ilustradas na figura 28.

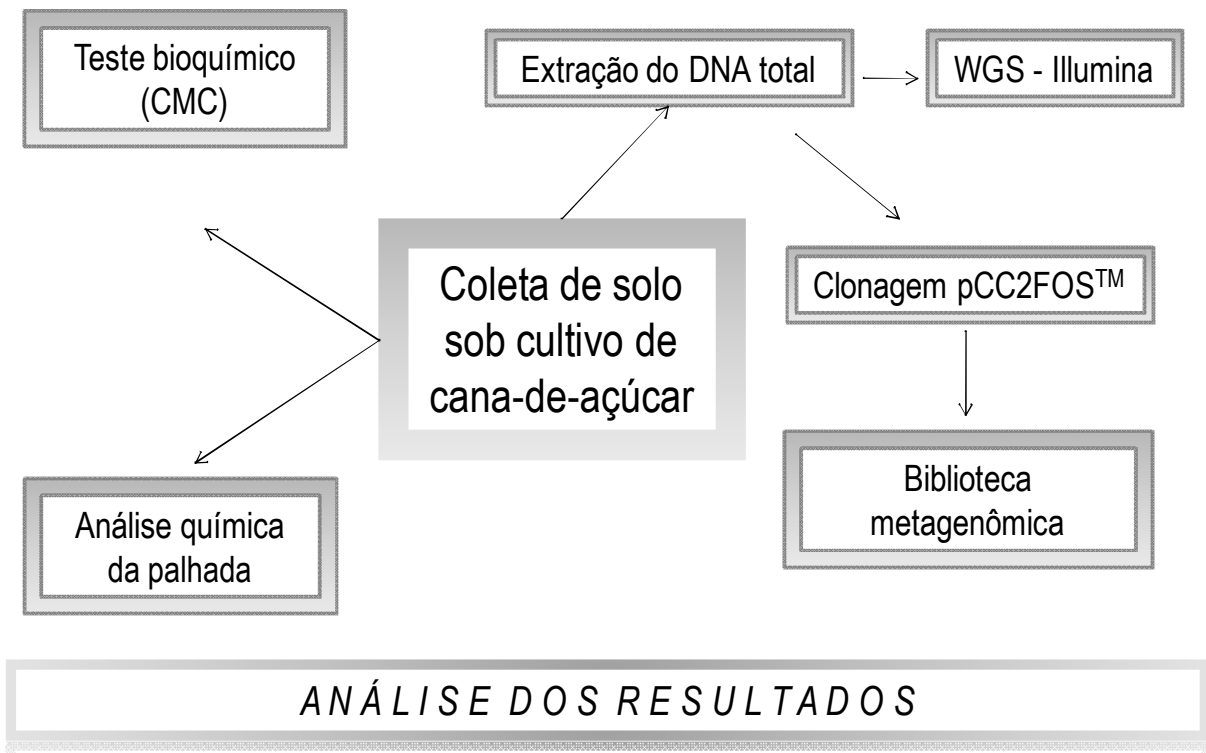


Figura 28: Fluxograma do trabalho desenvolvido

### **Parte I – Construção da biblioteca metagenômica da amostra de solo sob cultivo de cana-de-açúcar**

#### **1. Extração de DNA total dos micro-organismos do solo**

A amostra ambiental está descrita no capítulo anterior. A obtenção do DNA total dos micro-organismos foi realizada com o FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil (BIO 101-Quantum Biotechnologies), seguindo as recomendações do fabricante.

O protocolo consiste em adicionar 500 mg de solo em tubos de sílica onde foi adicionado 978 µl de tampão de fosfato de sódio (pH 8,0) e 122 ml de tampão MT. A mistura foi submetida à agitação vigorosa em aparelho FastPrepR FP120 (BIO 101 – SAVANT) à 5.5 m/s e em seguida os tubos foram conduzidos a uma centrifugação de 14.000 g durante 1 min em temperatura ambiente (22°C). Posterior à centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos estéreis onde 250 µl de uma solução de precipitação de proteínas foi adicionado. As

amostras foram homogeneizadas cuidadosamente 10 vezes por inversão e submetidas novamente a uma centrifugação de 14.000 g por 5 min a 25°C com intuito de precipitar os sedimentos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos devidamente esterilizados de 15 ml de volume acrescido de 1 ml da solução Binding Matrix Superior. Os tubos foram invertidos por 2 min e em seguida permaneceram em repouso a temperatura ambiente durante 3 min. Foram removidos 500 µl do sobrenadante das amostras e o restante foi homogeneizado em agitador de tubos. O volume total desta solução foi transferido para um tubo com filtro onde foi centrifugado a 14.000 g por 1 min em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e o que permaneceu no filtro foi conduzido à centrifugação de 1 min novamente. Posteriormente foram adicionados 500 µl da solução de lavagem dos sais e etanol de nome SEWS-M onde houve novamente uma centrifugação de 14.000 g por 3 min em temperatura ambiente com o objetivo de obter a precipitação dos DNAs. A amostra foi totalmente limpa de qualquer resíduo de etanol submetendo as mesmas a centrifugação em um liofilizador por 10 min (Hetovac).

A eluição do DNA ocorreu acrescentando junto ao filtro 50 µl de solução DES contendo água ultra-pura. Os filtros foram levados à centrifugação de 14.000 g por 2 min em temperatura ambiente. Ao final do procedimento de obtenção do DNA total dos micro-organismos, este material genético foi mantido em 20°C negativos.

## **2. Avaliação do DNA total extraído**

A qualidade do DNA foi observada em eletroforese de gel de agarose 0,6% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml). A condução deste método ocorreu em cuba modelo Horizon 11-14 com alíquota de 3 µl de DNA com 3 µl de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de glicerol (v/v)]. O procedimento ocorreu com tampão TEB 1X [Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM (pH8,0)] à 80V. Como referência foi utilizado o marcador molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas). O DNA do gel pode ser observado sob luz UV e a imagem documentado por meio do aparelho fotodocumentador (Bio Rad – Gel Doc

1000), por meio do programa Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA). A quantificação do DNA foi realizada em aparelho Nanodrop.

### **3. Seleção e obtenção do DNA metagenômico de tamanho adequado**

O tamanho adequado do DNA foi obtido por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (p/v). Anterior ao procedimento, a cuba foi submetida à descontaminação de quaisquer restos de brometo de etídio com hipoclorito 4% (v/v) por 20 min e em seguida colocado sob a exposição de luz UV durante 15 min. A quantia de 20 µl de DNA metagenômico foi aplicada ao gel e 100 ng do marcador de 36 Kb T7 “control” DNA (Epicentre) foi utilizado como referência ao padrão de tamanhos. O restante de todo o DNA foi aplicado na canaleta seguinte do gel. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X [40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA] sem brometo de etídio à 30 V durante 8 h em temperatura de 4°C. Após a eletroforese, o tamanho de DNA entre 20 e 45 Kb foi recuperado do gel e conduzido ao processo de eluição.

As amostras com DNA de tamanho selecionado foram incubadas em banho-maria a 65°C por 15 min e seu volume ajustado para 500 µl com tampão TE (10:1) pH 8,0. Em seguida, 10 µl do tampão da enzima gelase e 3 µl da referida enzima, respectivamente, foram adicionados às amostras. A reação foi levemente homogeneizada e conduzida a uma brevemente centrifugação (spin). As amostras foram incubadas a 45°C em banho-maria por 1 h. Posterior ao período de incubação foi acrescido aos tubos acetato de amônio 5 M (igual volume), e centrifugados a 14.000 g por 10 min com objetivo de precipitar o material insolúvel. Em seguida, o sobrenadante (95%) foi transferido para um novo recipiente estéril, onde foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 2 volumes de etanol absoluto e mantido em ultra freezer (-80°C) durante 30 min. O material foi conduzido à centrifugação de 14.000 g por 20 min em 4°C e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foi adicionado 1 ml de etanol 70% submetido a centrifugação de 14.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante descartado. Após total evaporação do etanol o DNA foi ressuspendido em 40 µl de água ultra-pura e avaliado em gel de agarose

0,8% acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/ml) em eletroforese com tampão TEB 1X a 80 V por pouco mais de 1 h.

#### **4. Reparo das extremidades das fitas do DNA metagenômico**

A reação de reparo dos terminais do DNA foi realizada tendo em vista o vetor utilizado neste kit de construção da biblioteca metagenômica. O vetor é aberto no sítio de restrição da enzima *Sma*I, onde o corte resulta em terminais cegos (ou abruptos). Fato este, que levou ao reparo dos terminais do DNA metagenômico, segundo descrito pelo fabricante do kit, para que fosse possível a ligação com o vetor. A quantidade de 22 µg de DNA foi necessária para realizar este procedimento em um volume de 50 µl. Foram adicionados 8µl de tampão de reparo 10X (Epicentre); 8 µl de dNTP; 8 µl de 10 mM de ATP e 4 µl de enzima de reparo (Epicentre). A reação permaneceu a temperatura ambiente por 45 min e posteriormente, a 75°C por 20 min para inativar as enzimas. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C até posterior utilização.

#### **5. Ligação molecular do inserto de DNA ao vetor fosmídeo**

O vetor utilizado é constituído de 8.181pb (Figura 29), linearizado no sítio de restrição único da enzima *Sma*I e desfosforilado.

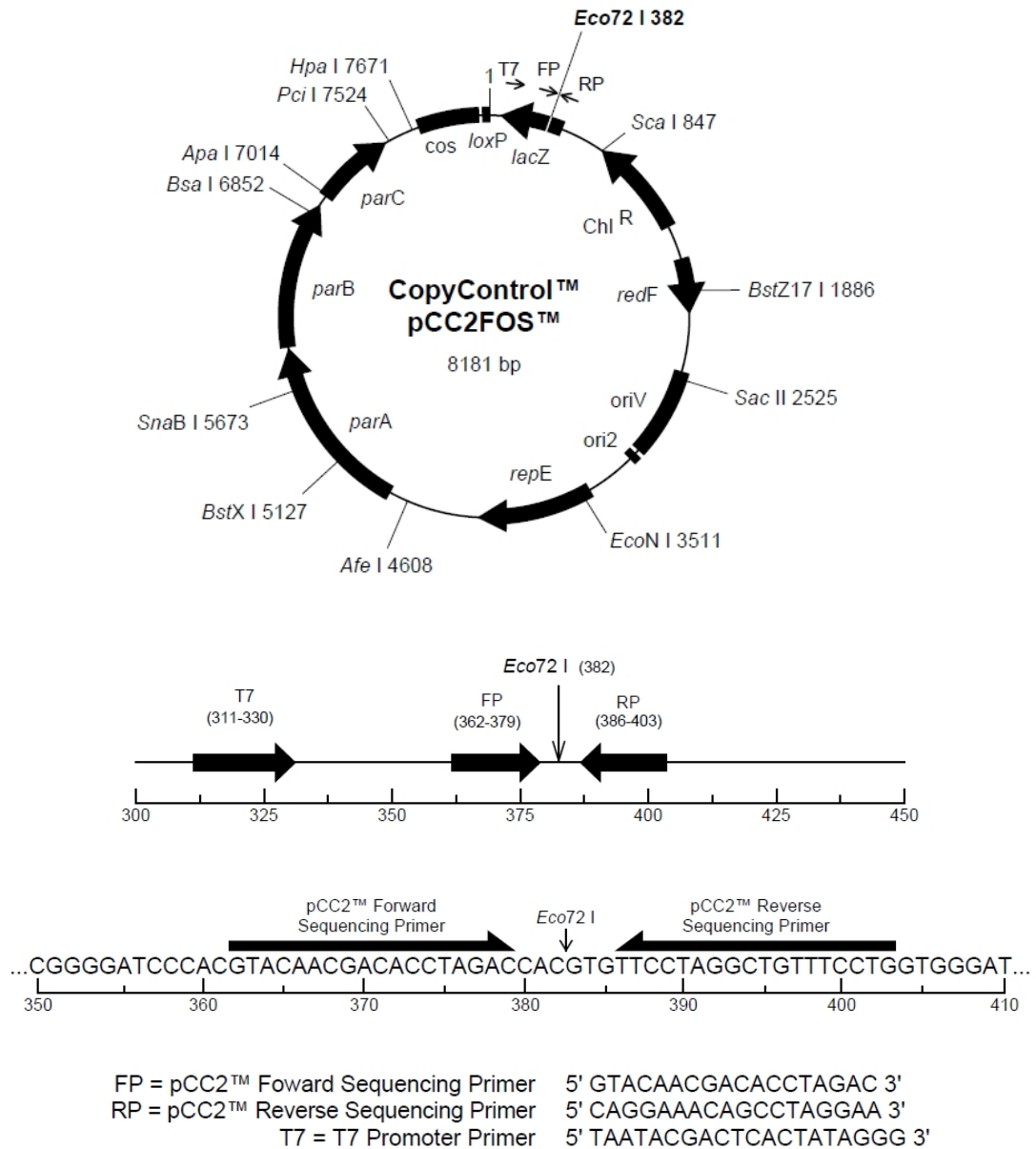


Figura 29: Mapa do vetor pCC2FOS™ da Epicentre Biotechnologies.

A reação de ligação foi realizada com a relação inserto/vetor na proporção [1:10] pré estabelecida pelo kit. A razão molar foi calculada pela seguinte fórmula:

$$m_i = \frac{t_i \times m_v}{t_v}$$

Onde,  $mi$  representa a massa do inserto;  $ti$  é o tamanho do inserto;  $mv$  indica a massa do vetor e  $tv$  se refere ao tamanho do vetor e ao final o valor é dividido por 10. A ligação foi feita para uma reação de 20  $\mu$ l, onde foram 2  $\mu$ l de inserto de DNA metagenômico ( $\pm 0,2 \mu$ g ;  $\pm 30$ Kb); 1  $\mu$ l do vetor; 2  $\mu$ l do tampão de ligação 10X; 1  $\mu$ l da enzima ligase e o restante do volume foi ajustado com água ultra-pura. A reação ocorreu a 16°C por aproximadamente 22 h até a próxima etapa.

## **6. Empacotamento do DNA metagenômico recombinante ao fago**

O extrato de empacotamento (fagos) com volume de 50  $\mu$ l foi retirado do ultrafreezer e mantido em gelo em torno de 5min. Ao DNA recombinante (inserto + vetor), foi adicionado 25  $\mu$ l do fago de forma delicada e foram cuidadosamente homogeneizadas. A reação foi incubada a 30°C por 90 min, e ao término deste período, foi adicionado ao material o restante dos 25 $\mu$ l do extrato de empacotamento e novamente incubadas por 30 min a 90°C. Após o período de empacotamento, foram adicionados 500  $\mu$ l de tampão de diluição de fagos [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); NaCl a 100 mM e 10 mM de MgCl<sub>2</sub>] e 25  $\mu$ l de clorofórmio. O material foi agitado por inversão e mantido em estoque a 4°C.

## **7. Inóculo de células EPI300-T1<sup>R</sup> e reação de infecção**

O preparo das células competentes de *Escherichia coli* estirpe denominada EPI300-T1<sup>R</sup> (mantidas no estoque em 80°C negativos), foi realizado um dia antes da reação de empacotamento. O procedimento foi conduzido com uma colônia de células obtida por isolamento das placas de meio de cultivo LB (Luria Bertani) sólido incubadas por 12 h em B.O.D de 37°C. A colônia isolada obtida foi transferida para meio LB líquido acrescido de 0,5 mM de MgSO<sub>4</sub> onde permaneceu incubada por 12 h sob constante agitação de 200 rpm a 37°C. Após o período de preparo do pré-inóculo para obtenção das células competentes, 5 ml deste pré-inóculo foram transferidos para o inóculo (50 ml de LB + 0,5 Mm de MgSO<sub>4</sub>). O inóculo foi mantido sob agitação de 200 rpm a 37°C até atingir a densidade óptica (DO) a 600 nm, entre 0,8 e 1,0, aferida em aparelho Biophotometer (EPPENDORF).



A cada 10 µl dos fosmídeos empacotados foram adicionado 100 µl de células competente EPI300-T1<sup>R</sup>. Os tubos foram agitados gentilmente e incubados em termociclador a 37°C por 20 min, período em que ocorreu a infecção. Posterior a este período, os 110 µl de cada tubo foram inoculados em placas de meio sólido de cultivo LB com cloranfenicol (12,5 µg/ml). As placas permaneceram incubadas em BOD 37°C durante a noite. Os clones obtidos foram coletados com palito de madeira estéril e transferidos para placas de estoque de clones de 96 poços contendo 120 µl de LB com cloranfenicol (12,5 µg/ml). As placas seladas, com certa aeração, foram incubadas em BOD de 37°C por 22 h. O estoque do clones da biblioteca metagenômica é mantido com 120 µl de glicerol (40%) em 80°C negativos no LBMP.

## **8. Extração de DNA fosmidial para validação da biblioteca metagenômica**

O DNA fosmidial de alguns clones selecionados ao acaso, foram extraídos segundo protocolo proposto por Sambrook e Russel (2001) em tubos estéreis de 15 ml. Os clones foram replicados nos tubos contendo 3 ml de meio LB acrescido de cloranfenicol (12,5 µg/ml), onde permaneceram sob constante agitação de 240 rpm à 37°C durante 22 h. Após este período, o cultivo dos clones foi levado a centrifugação de 15294 xg por 6 min e posteriormente o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 100 µl de solução I [50 mM de glicose; 25 mM de Tris-HCl (pH8,0) e 10 mM de EDTA (pH8,0)], e conduzidos a vigorosa agitação por 2 min. Posteriormente à ressuspensão celular, foram adicionados 150 µl de solução II [0,2 NaOH e SDS 1%] recém preparada. Após a adição da solução de lise celular, os tubos foram invertidos 5 vezes para homogeneização das soluções junto às células e permaneceram incubados à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2,5 ml de solução III gelada [5 M de acetato de potássio (60 ml); ácido acético glacial (11,5 ml) e 28,5 ml de água] e os tubos foram agitados vigorosamente e deixados sob temperatura ambiente por 10 min. Os tubos foram submetidos à centrifugação de 12000 xg durante 8 min em 4°C e o sobrenadante, em seguida, foi transferido para novos tubos ao qual foi adicionado fenol:clorofórmio [1:1]. Os tubos foram

agitados em agitador durante alguns segundos e levados à centrifugação de 12000 xg por 5 min a 4°C. O sobrenadante coletado foi transferido novamente para um novo tubo, e a estes foram acrescentados 1 volume de isopropanol e 0,1 volume de NaOAc 3 M (pH 5,2). As amostras permaneceram em 80°C negativos para precipitação do DNA fosmidial e posterior a este período, foram levadas à centrifugação de 13000 xg por 30 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos em papel absorvente em torno de 5 min a fim de eliminar resíduos de álcool. Ao precipitado, foram adicionados 1 ml de etanol 70%, centrifugados por 5 min em 4°C sob agitação de 12000 xg e, em seguida, o etanol foi descartado. Após secagem do DNA em fluxo laminar por aproximadamente 20 min, foram adicionados 35 µl de TE [Tris-HCl 10 mM pH8,0 e 1 mM de EDTA pH8,0], contendo RNase (20 µg/ml). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 30 min e em seguida estocadas em 20°C negativos. A quantificação foi realizada por aparelho Nanodrop e a qualidade dos DNA fosmidiais foi avaliada em gel de agarose 0,8%.

O DNA fosmidial dos clones aleatoriamente escolhidos foram conduzidos a reação de digestão enzimática com a enzima *BamHI* (Promega) em tubos de 1,5 ml estéreis adicionando 2 µg do DNA; 2 µl de tampão 10X (Promega); 1 µl da enzima de restrição *BamHI* (20U/µl) e o volume foi ajustado com água ultra pura em quantidade suficiente para (qsp) 20 µl. A reação ocorreu por 1 h em 37°C e a avaliação da restrição foi possível de ser visualizada em gel de agarose 0,8%.

## **9. Montagem dos “pools” de clones da biblioteca metagenômica e extração de DNA**

As placas de clones da biblioteca metagenômica, foram replicadas em 1 ml de LB com cloranfenicol e solução de indução (Epicentre) e mantidas sob cultivo por 22 h em agitação constante de 300 rpm em 37°C. Posteriormente, as placas foram levadas a centrifugação de 3220 g a 20°C por 10 min e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 240 µl de solução GET [50 mM de glicose; 25 mM de Tris-HCl pH8,0 e 10 mM de EDTA pH8,0] onde a ressuspensão foi realizada com vigorosa agitação por 2 min. As amostras foram levadas a centrifugação de 3220 g a

20°C por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento celular foi novamente ressuspendido em 100 µl de GET e os 96 clones foram unidos em uma única amostra, que se tornou um “pool” sendo este então, representativo de uma placa em tubos de 15 ml. O volume de cada pool foi de 9,6 ml sendo que 1 ml foi retirado para a extração de DNA o qual foi realizado segundo protocolo de Sambrook e Russel (2001).

### **Parte II – Propriedades químicas da palhada sobre o solo**

As propriedades da palhada coletada no campo sobre o solo após a colheita mecanizada da cana-de-açúcar crua foram analisadas no Departamento de Zootecnia, no Laboratório de Nutrição Animal.

### **Parte III – Atividade bioquímica de degradação de celulose**

O procedimento utilizado para obter clones com atividade degradativa em meio contendo substrato celulósico, foi realizado com células de *E. coli* com o DNA metagenômico recombinante estocado nos fagos. A infecção ocorreu da mesma forma como foi feita na construção da biblioteca metagenômica, porém, a única alteração foi na inoculação final das bactérias recombinantes em meio de cultivo modificado em relação ao LB original. O meio de cultivo utilizado para este teste bioquímico foi o LB com a seguinte composição: 5 g/l de peptona; 3 g/l de extrato de levedura e 13 g/l de Agar. Posteriormente à esterilização em autoclave, e anterior ao plaqueamento, foram acrescentados cloranfenicol (12,5 µg/ml) + arabinose (1%) + 0,25 g de carboximetilcelulose (CMC) para cada 50 ml de água quente. O plaqueamento do meio modificado foi feito em placas de petri ao qual foram inoculados aproximadamente 20 µl por placa de células infectadas com o DNA fosmidial. Em seguida, as placas permaneceram incubadas em BOD 37°C até o surgimento de clones. Após o período de incubação, as placas foram coradas com vermelho congo por 20 min, sendo o excesso descartado. Em seguida, as placas foram lavadas com solução salina (0,85%) por 10 min e o excedente foi descartado. Os clones que se

desenvolveram, foram mantidos em posteriores inoculações em novas placas com o mesmo meio a fim de intensificar a expressão de genes com atividade celulolítica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Palhada de cana-de-açúcar deixada sobre o solo após colheita mecanizada

Com o objetivo de obter informações a cerca do potencial da palhada de cana-de-açúcar, e seu importante papel para a microbiota presente no solo, a análise química possibilitou explorar este material agregando conhecimentos sobre o ambiente microbiano. As propriedades deste material incluem principalmente a quantidade de energia bruta (3899,91,91 cal/g) como também outras estruturas detalhadas na tabela 04.

Índices	Resultados (%)
Matéria seca	94,54
Matéria mineral	7,88
Proteína bruta	5,81
Matéria fibrosa	36,03
Extrato Etéreo	1,11
Extrato não nitrogenado	43,71
Fibra em detergente neutro	80,4
Fibra em detergente ácido	46,28
Lignina	7,89
Energia bruta	3899,91 cal/g

*OBS: Resultados expressos na 2ª matéria seca*

Tabela 04: Propriedades da palhada de cana-de-açúcar deixada sobre o solo após colheita mecanizada.

A palhada deixada sobre o solo após a colheita da cana-de-açúcar contribui diretamente para a formação da matéria orgânica no solo, sendo esta metabolizada pela comunidade microbiana contribuindo com a ciclagem dos nutrientes. Como

visto no capítulo anterior o alto teor de matéria orgânica no solo é destaque para a atuação dos micro-organismos.

A importância em se explorar a palhada e o que representa quando deixada sobre o solo, foi notícia publicada pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE). De acordo com um modelo matemático denominado “Century” que foi desenvolvido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP de Piracicaba, foi comprovado que manter a palhada (restos de cana-de-açúcar que permanecem no solo após a colheita) aumenta significativamente a fixação de carbono na terra. A pesquisa também confirma que a colheita mecanizada da cana-de-açúcar, além de propiciar a manutenção da palhada sobre o solo, diminui a emissão de CO<sub>2</sub> para a atmosfera, o que atenua o efeito estufa. Segundo Marcelo Valadares Galdos, pesquisador do CTBE, durante o processo de decomposição desse material, parte do carbono fica incorporada ao solo. Esse processo é conhecido como ‘sequestro de carbono’, importante no que se refere a uma diminuição significativa no resultado do cálculo do ‘carbon footprint’ do etanol (CTBE, 2011).

O solo em uma situação estável significa que sob vegetação nativa inalterada possui teores de matéria orgânica (MO) que se mantêm estáveis no tempo, ou seja, as adições de C orgânico via resíduos vegetativos e sua conversão em MO são da mesma quantidade que o C perdido pela mineralização da MO pela atividade metabólica da microbiota. Contudo, quando ocorre a utilização da terra para cultivo, os índices de acúmulo ou perda da matéria orgânica do solo podem variar conforme características do solo, sistemas de cultivo, culturas e condições climáticas (PINTO et al., 2013).

O sistema de plantio direto ou sistema de semeadura direta mobiliza o solo apenas na linha de semeadura, ou seja, mantém em sua superfície uma cobertura com os restos vegetais da cultura, no caso, a palhada da cana-de-açúcar. A aplicação de práticas com menor revolvimento do solo e manutenção destes resíduos é uma estratégia potencial na recuperação dos teores de carbono do solo. Além de mitigar efeitos de erosão, a diminuição da variação da temperatura e conservação da água nas camadas mais superficiais do solo influencia

favoravelmente no aumento da população de macro e micro-organismos responsáveis pela dinâmica da matéria orgânica do solo (PINTO et al., 2013).

O crescente acúmulo de palhada deixada sobre o solo é benéfico para diversas características de proteção do solo, contudo apesar de todos os benefícios, o acúmulo também pode ser prejudicial. Um dos problemas seria a elevada relação C/N deste material, o que reduz a mineralização, e essa elevada relação permite a imobilização de grande parte do nitrogênio aplicado na cultura, principalmente quando o nutriente não atinge o solo, ficando sobre a palhada (MATHEUS, 2012). A alternativa seria deixar parte da palhada sobre o solo e aplicar a outra parte à obtenção de glicose oriunda da celulose, para produção de etanol de segunda geração, já que o acúmulo de energia contida neste material é grande.

### 3.2. Prospecção de celulases no metagenoma dos micro-organismos do solo

O cultivo de clones em placas de meio de cultivo, contendo como única fonte de carbono a carboximetilcelulose (CMC) possibilitou a obtenção de três clones com atividade de degradação. A CMC é um polímero aniônico derivado da celulose e sua estrutura é baseada sobre o polímero de celulose de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopirranose (Figura 30).

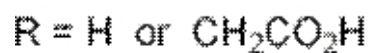
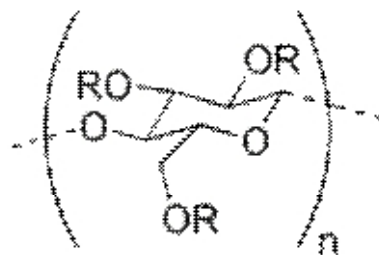


Figura 30: Estrutura química da carboximetilcelulose (CMC).

A hidrólise de CMC foi possível de ser visualizada na placa de petri contendo o meio LB acrescido de CMC pela formação de um “halo” ao redor da colônia de *E. coli* infectada pelo bacteriófago, o qual armazenava o DNA metagenômico da amostra de solo. O vermelho congo é um corante que se liga à molécula de celulose quando houve atividade metabólica de degradação da celulose, neste caso. Devido a ação enzimática de celulasas o meio com celulose sofre um processo de descoloração (WOO et al., 2003).

A identificação de clones oriundos do DNA metagenômico, é mais uma forte evidencia do quão o solo é rico em material com potencial a ser explorado para futuras aplicações. O intuito de encontrar enzimas com atividade celulolítica tem sido uma corrida mundial a fim de obtenção do máximo de energia contida na celulose.

Na tentativa de obter atividade de degradação da celulose, Grupta e Lee (2008) testaram diferentes substratos como algodão, filtro de papel Whatman nº 1, Avicel e  $\alpha$ -celulose em contato com enzimas celulolíticas a fim de observar a eficiência das atividades hidrolíticas. Camargo et al., 2005 relatam que as celulosas que não são facilmente degradadas pelas celulasas, como Avicel, algodão, celulose em pó e carboximetilcelulose (CMC) parecem ser os melhores substratos para induzir a produção de celulasas.

A complexidade da variável estrutura da celulose pura e a dificuldade de trabalhar com substratos insolúveis têm levado a um vasto uso de celulose solúvel – CMC, como um substrato para estudos de produção de endoglucanases. Infelizmente, o uso de CMC como um substrato enzimático, tem enfraquecido o significado do termo “celulolítico”, tendo por conhecimento que muitos organismos que não podem degradar celulose, podem hidrolisar CMC via mistura de enzimas  $\beta$ -glucan. Devido à substituição de produtos hidrolíticos, relativamente poucos micro-organismos (incluindo alguns fungos e estirpes de “*Cellulomonas*”) podem utilizar CMC como substrato para seu desenvolvimento (LYND et al., 2002).

Vários novos produtos de interesse biotecnológico foram descobertos por meio da abordagem metagenômica, dentre estes as celulasas (PANG et al., 2009; POTTKAEMPER et al., 2009). Rodrigues (2008) descreve a obtenção de celulasas obtidas por meio de PCR em biblioteca metagenômica de arboreto de eucalipto. Em 2007, Yi Feng e colaboradores, construíram uma biblioteca metagenômica cosmidial

utilizando DNA microbiano de ceco de coelhos, e isolaram onze clones com atividade celulolítica.

A busca por celulases em ambientes diversos com potencial enzimático vem sendo pesquisada fortemente, e a aplicação de abordagens como a metagenômica abre campos mais amplos para investigar de forma mais aprofundada a microbiota ambiental (GRUPTA & LEE, 2008; PANG et al., 2009; POTTKAEMPER et al., 2009).

### **3.3. Padrão de qualidade do DNA metagenômico e validação da biblioteca metagenômica**

A análise do perfil do DNA metagenômico (gel de agarose 0,6%) serviu como parâmetro para avaliar o padrão em termos de concentração e tamanho apropriado para o procedimento de construção da biblioteca (Figura 31). A amostra número 2, conforme ilustrado no gel da figura 31 foi utilizado para a construção da biblioteca metagenômica. O DNA apresentou pureza pela relação 260/280 de 1,80 indicando não haver presença de proteínas nas amostras. O tamanho do DNA foi estimado acima de 4 Kb até aproximadamente 20 Kb, passível de ser submetido à construção da biblioteca de DNA.

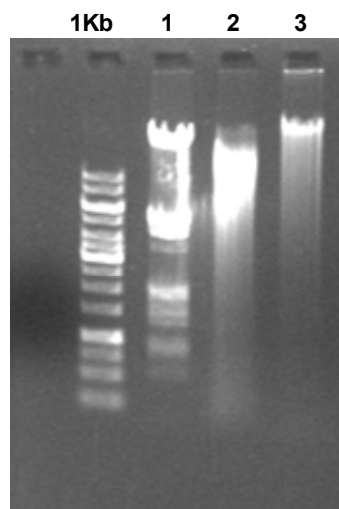


Figura 31: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,6% do DNA metagenômico do solo. A primeira canaleta corresponde ao marcador molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) e nas canaletas seguintes 1, 2 e 3 representam os DNAs extraídos.



A concentração estimada de DNA foi de 5.000 ng em um volume de 50 µl. O resultado foi satisfatório, uma vez que são necessários 20.000 ng de DNA para a construção de uma biblioteca metagenômica. As amostras extraídas indicaram boa qualidade por não haver restos de RNA. A biblioteca metagenômica obtida possui pouco mais de 17.280 mil clones e a validação foi realizada com a enzima de restrição *Bam*HI e apresentou tamanhos diversos de bandas (Figura 32), o que indica diversidade de DNA metagenômico distribuídos em tamanhos diferentes nos clones da biblioteca.

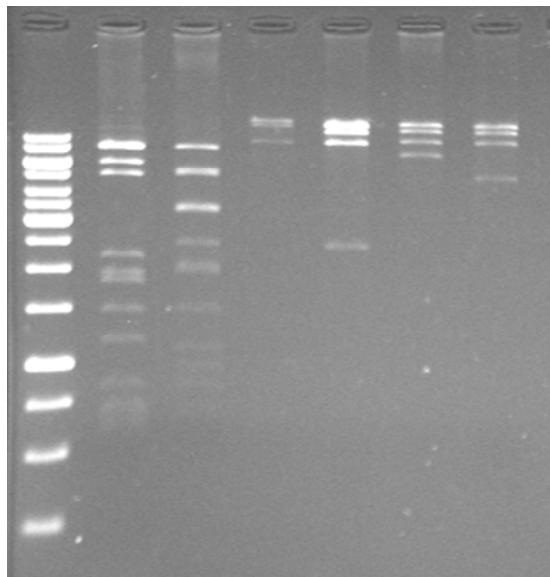


Figura 32: Restrição de DNA fosmidial com a enzima *Bam*HI de alguns clones da biblioteca metagenômica de solo sob cultivo de cana-de-açúcar. O marcador molecular é 1Kb DNA Ladder (Fermentas).

O DNA metagenômico extraído, além de ser utilizado para a construção da biblioteca, foi conduzido ao seqüenciador de nova geração Illumina<sup>®</sup> o que resultou em aproximadamente 65 milhões de sequencias metagenômicas que estão em análise pelo Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani, pesquisador do Departamento de Tecnologia.

### 3.4. Perfil da comunidade microbiana do solo por sequenciamento Illumina® (WGS)

A análise das sequências geradas por meio de sequenciador de nova geração Illumina® possibilitou a identificação de 40 categorias de genes presentes na comunidade microbiana do solo (Figura 33). O resultado obtido indica prevalência de *ATP Binding*, dentre outras diversidades de grupos como as *Hydrolases* e as *Oxidoreductases*.

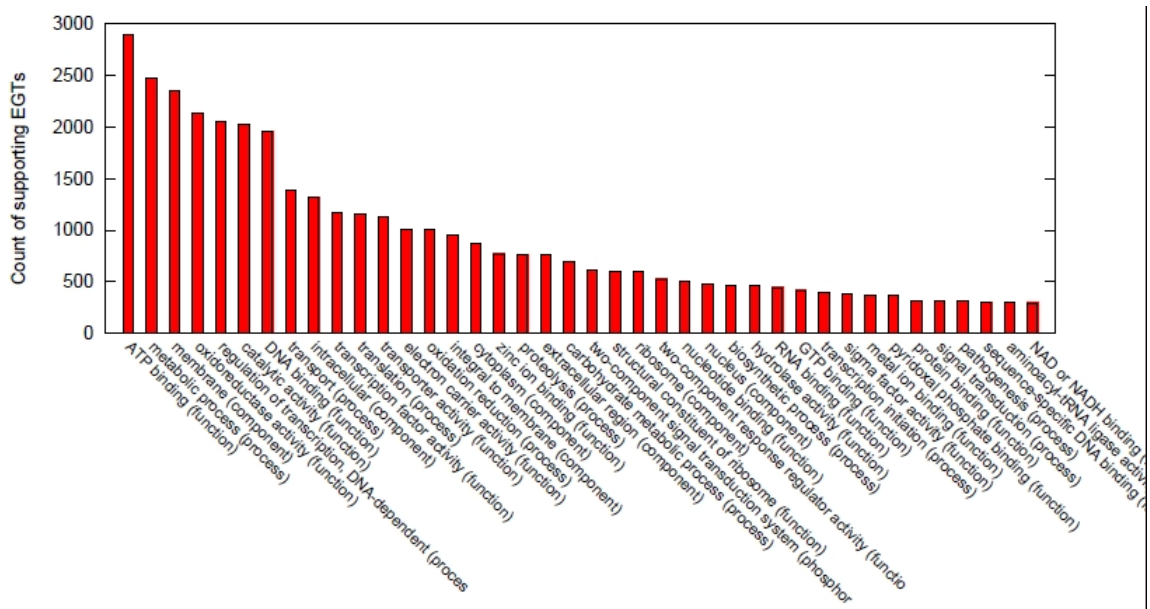


Figura 33: Categorias encontradas na amostra metagenômica de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

Maiores detalhes da quantidade e diversidade dos grupos funcionais encontrados estão disponíveis como material suplementar desta tese.

A classe denominada *ATP binding* ou transportadores de ATP (ABC-transporter) são pertencentes a uma das maiores e mais antigas famílias de proteínas, com representantes em todos os filós existentes, desde procariotos a seres humanos. Estes transportadores são proteínas transmembrânicas que utilizam a energia do ATP (Trifosfato) e a hidrólise de adenosina para realizar certos processos biológicos, como translocação de vários substratos através das membranas. Participa também de processos não relacionados com o transporte, como a tradução de RNA, reparação de DNA e regulação genética. Realizam o transporte de uma ampla variedade de substratos através das membranas extra e

intracelular, como produtos metabólicos, lipídios e esteróis. Os genes ABC são divididos em sete subfamílias distintas: ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20 e White. No caso da *E. coli* muito comum nos solos sob cultivo de cana-de-açúcar, tendo em vista que encontramos vários representantes na biblioteca metagenômica que construímos, possuem o transporte ABC bem conhecido. Este domínio ABC é considerado conservado com aparente existência antes da divergência evolutiva entre procariotos e eucariotos. Sendo assim, os transportadores ABC possuem importante função bioquímica nas células procarióticas e eucarióticas, essencial para a regulação e harmonização do metabolismo (LENINGHER).

Em se tratando de transporte celular, de acordo com a ampla proporção destes que encontramos na metagenoma do solo, um de extrema importância no envolvimento para obtenção de combustível de energia limpa, são os responsáveis na interligação das moléculas celulósicas.

A insolúvel e recalcitrante natureza da celulose representa um desafio para os sistemas das celulases. Uma característica geral da grande maioria das celulases é a estrutura modular incluindo freqüentemente módulos catalíticos e módulos de ligação de carboidratos (“*carbohydrate-binding modules*” – CBMs). Os efeitos da ligação de CMB na superfície da celulose facilitam sua hidrólise por aproximar o domínio catalítico do substrato. A presença de CBMs é particularmente importante para iniciação e atividade das exoglucanases (LYND et al., 2002).

As glicosídeo hidrolases pertencem a um grupo comum de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e uma porção de carbono. O banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) fornece uma lista sempre atualizada das famílias das glicosídeo hidrolases e suas características específicas. Há dez anos, um grupo de microbiologistas já vinha elucidando aspectos relacionados ao grupo das hidrolases, especificamente abordando aspectos sobre quais micro-organismos apresentavam maior atividade de transformação de compostos de carbono e nitrogênio. Os seus resultados mostraram que a população e habilidade enzimática dos fungos foram menores que as das bactérias, o que sugere menor participação na transformação dos nutrientes no solo. As bactérias apresentaram múltiplas atividades enzimáticas, mostrando maior versatilidade que os fungos (SANOMIYA e NAHAS, 2003).

Descrever sobre as hidrolases é extenso, uma vez que agrega mais de 100 grupos catalogados e os que não estão diretamente envolvidos, mas, participam indiretamente em alguns processos bioquímicos (sequências ainda não classificadas) (CAZy 2013).

Enzimas hidrolíticas estão entre os principais alvos da pesquisa biotecnológica pelo grande potencial de aplicação no setor industrial. Baratto e colaboradores em 2011 com o objetivo de selecionar e caracterizar micro-organismos amilolíticos, pectinolíticos e xilanolíticos, utilizaram solos e resíduos agroindustriais como fonte para o isolamento. Em seus resultados encontraram dezoito cepas produtoras de amilase, quatro micro-organismos produtores de pectinase e treze micro-organismos produtores de xilanases (onze bactérias e dois fungos filamentosos). A tecnologia enzimática vem sendo utilizada por oferecer vantagens no estabelecimento de um processo tecnologicamente limpo (BARATTO et al., 2011).

As oxidorreduções catalisam as reações de óxido-redução em sistemas biológicos e estão relacionadas com os processos de respiração e fermentação. Nesta classe estão incluídas as hidrogenases, oxidases, peroxidases (usam peróxido de hidrogênio como agente oxidante), hidroxilases (introduzem hidroxilas em moléculas insaturadas) e as oxigenases (oxidam o substrato a partir de  $O_2$ ). Os destinados à remoção de enxofre consistem principalmente na redução de sulfato e oxidação de sulfeto.

Poucas pesquisas têm sido destinadas à remoção combinada de nitrogênio e enxofre que é um processo que consiste na redução de uma fonte de nitrogênio a gás nitrogênio, oxidando uma fonte de enxofre, geralmente sulfeto ou tiosulfato a enxofre elementar. Este processo possui a vantagem de evitar a emissão de sulfeto durante a remoção de enxofre, devido à formação de enxofre elementar, que é removido juntamente com a biomassa. Acredita-se que este processo se estabeleça devido ao metabolismo do *Thiobacillus denitrificans*, uma bactéria facultativa, quimio-autotrófica obrigatória, capaz de promover a desnitrificação via integração dos ciclos bioquímicos destes elementos. Grupos de pesquisa de diversos países, como Holanda, China e Brasil realizam pesquisas para identificar os aspectos

fisiológicos dos microrganismos e seu comportamento em reatores destinados ao tratamento de efluentes (HOBUSS et al., 2007).

BELLER et al. (2006) pesquisaram e identificaram o genoma completo do *Thiobacillus denitrificans* (ATCC 25259). A identificação completa dos genomas permite elucidar mecanismos de oxidação aeróbia e anaeróbia de compostos de enxofre, além de revelar componentes genéticos envolvidos na respiração aeróbia, metabolismo de hidrogênio, metabolismo do carbono, desnitrificação e metabolismo intermediário. A seguir apresenta-se uma síntese dos resultados de identificação do genoma do *Thiobacillus denitrificans* (HOBUSS et al., 2007).

A maioria das enzimas relevantes para a indústria são de origem microbiana, por isso a procura por novas enzimas é um ponto importante para o desenvolvimento dos bioprocessos industriais (UCHIYAMA e MIYAZAKI, 2009).

### **3.5. Perfil da comunidade microbiana do solo por sequenciamento Sanger**

Utilizando primers para rastrear genes que degradam amido e celulose por meio das sequencias nos clones da biblioteca metagenômica, no BLASTN, as maiores similaridades foram relacionadas com membros do gênero *E. coli* e *Shigella* sp. Os 5 primeiros membros encontrados foram: (i) *E. coli*, com cobertura de 21%, e-value  $9 \times 10^{-46}$ , identidade de 94% e acesso CP004009.1; (ii) *E. coli*, com cobertura de 21%, e-value  $9 \times 10^{-46}$ , identidade de 94% e acesso CP001925.1; (iii) *E. coli*, com cobertura de 21%, e-value  $9 \times 10^{-46}$ , identidade de 94% e acesso CP002967.1; (iv) acesso CP002970.1 e (v) acesso CP002291.1.

O BLASTN evidenciou similaridade com pseudorinas sintase A da região do ribossomo, com número de acesso CP004009.1 e identidade AGC85485.1 mostrou que esta proteína esta relacionada com a subunidade maior do ribossomo e possui 219 aminoácidos. O confronto de sequencias de nucleotídeos no BLASTX mostrou similaridade com proteínas codificadas pela bactéria *Shigella flexneri* com maior frequência. O primeiro indivíduo apresentou cobertura de 16%, e-value  $2 \times 10^{-9}$ , identidade de 87%, identidade 87% e acesso YP00572569.1. A proteína foi pseudouridine synthase A relacionada a região maior do ribossomo.

O algoritmo ORF Finder identificou 3 regiões em potencial como codificadoras, sendo que 1 delas localizada na primeira tradução hipotética e, as outras 2, na terceira tradução hipotética para uma fita positiva. A primeira fita hipotética mostrou similaridade com proteína W09G3.4 de *Caenorhabditis elegans*, com cobertura de 73%, e-value 9.6, identidade 40% e acesso C87992, sendo este um organismo eucarioto. A sequência mostrou potencial para 2 regiões de start e 1 região para stop códon (ATG, ATG e TGA) com 255pb.

A segunda fita hipotética mostrou similaridade com 4 proteínas diferentes: (i) *Auricularia delicata* (eucarioto), cobertura 65%, e-value 0,075, identidade 45% e acesso EJD51851.1. A proteína em questão é a “P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase protein” de um fungo e com um gene codificante de 1.489 aminoácidos. (ii) *Gaeumannmyces graminis* (eucarioto), cobertura de 52%, e-value 1.7, identidade 48% e acesso número EJT73450.1. A proteína é a “hypothetical protein” GGTG\_10288 de um fungo e com um gene codificante de 809 aminoácidos. (iii) *Ovis Áries* (eucarioto - Metazoa), com cobertura de 71%, e-value 2.7, identidade de 32% e acesso XP\_004018141.1. A proteína é a “predicted: proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1” e com um gene codificante de 425 aminoácidos. (iv) *Amopheles gambiae* (eucarioto), com cobertura de 61%, e-value 4.4, identidade de 31% e acesso número XP\_312973.4. A proteína é a “AGAP004099-PA” de um metazoa com gene codificante de 446 aminoácidos. O organismo *Auricularia delicata*, quando pesquisado CDD (Conserved Domains and Protein Three-dimensional Structure): 131259, mostrou similaridade com um “ABC transporter permease/ATP binding protein”. Esta proteínas tem relação com *Proteobacteria* (transportadoras de ATP e exporta lipídio A) e em eucariotos (P-glicoproteínas).

A terceira fita hipotética mostrou similaridade com 2 proteínas diferentes: (i) *Cryptococcus gatii* (eucarioto), com cobertura de 55%, e-value 7.9, identidade de 63% e número de acesso XP.003191260.1. A proteínas é a “hypothetical protein GCB\_A2330W” de um fungo e com gene codificante de 449 aminoácidos. (ii) *Cryptococcus neofarmans* (eucarioto), com cobertura de 55%, e-value 9.7, identidade 63% e acesso XP\_569210.1. A proteína é a “hypothetical protein” de um fungo e com um gene codificante de 449 aminoácidos.

Uma das posteriores análises com o que encontramos pelo rastreamento das sequencias fosmidiais da biblioteca metagenômica, está com base em resultados do BLASTN, o resultado que mais se aproxima com o do ORF Finder, foi o da segunda região hipotética com 4 proteínas. Fato este, devido a análise do CDD:131259 de EJD518511, obteve-se um retorno da “ABC transporter permease/ATP-binding protein” identificada em *Proteobacteria* e em eucariotos. Estes resultados corroboraram com os obtidos pela análise WGS com a plataforma Illumina, dispostando como uma das mais abundantes categorias funcionais encontradas na comunidade microbiana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

#### **4. CONCLUSÃO**

A construção de uma biblioteca metagenômica fosmidial de DNA microbiano de solo sob cultivo de cana-de-açúcar, possibilitou a identificação de três clones com atividade hidrolítica em meio de cultivo contendo carboximetilcelulose.

A plataforma Illumina possibilitou identificar *in silico* uma diversidade de genes dentre eles, diversas ATP *binding*, hidrolases e oxidoredutases.

A análise de rastreamento por PCR (Sanger) identificou diversas sequencias dentre elas, a de maior destaque foi ATP *binding* que corroborou com os dados WGS obtidos pelo Illumina.

## 5. REFERÊNCIAS

- CAZY. **Carbohydrate-Active enZymes**. Disponível em: < <http://www.cazy.org/>>. Acesso em 13 de abril de 2013.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_04\\_09\\_10\\_29\\_31\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_abril\\_2013\\_1o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_29_31_boletim_cana_portugues_abril_2013_1o_lev.pdf)>. Acesso em 25 junho, 2013.
- COWAN, D. et al. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 321-330, 2005.
- CTBE. **Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol**. Disponível em: < <http://www.bioetanol.org.br/workshops-e-eventos/detalhe.php?ID=MTE3>>. Acesso em: 01 de julho de 2013.
- GUPTA, R.; LEE, Y.Y. Mechanism of Cellulase Reaction on Pure Cellulosic Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, 2009.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; van ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- LORENZ, P.; ECK, J. Screening for Novel Industrial Biocatalysts. **Eng. Life Sci**, v. 4, n. 6, p. 501-504, 2004.
- PARK, S-J.; KANG, C-H.; CHAE, J-C.; RHEE, S-K. Metagenome microarray for screening of fosmid clones containing specific genes. **FEMS**, v. 284, p. 28-34, 2008.
- REYNOL, F. Bagaço de qualidade: Pesquisadores da Unicamp desenvolvem equipamento para facilitar a obtenção do etanol celulósico. **Revista FAPESP** – Janeiro, p.72-73, 2010.
- RODRIGUES, G.R. **Prospecção de genes de celulase presentes em biblioteca metagenômica**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- ROLF, R. The metagenomics of soil. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 470-478, 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. v. 3, 2001.
- SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.



SIMON, C.; DANIEL, R. Construction of small-insert and large-insert metagenomic libraries. **Methods in Molecular Biology**, v. 668, p. 39-50, 2010.

STREIT, W.R.; SCHMITZ, R.A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 492-498, 2004.

THIMOTEO, S.S. **Isolamento e caracterização molecular de três quitinases de uma biblioteca metagenômica**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

# **MATERIAL SUPPLEMENTAR**

Tabela 05: Classificação das OTUs de 120 mil sequências de DNA metagenômico de solo sob cultivo de cana-de-açúcar pelo WebCarma em confronto com os bancos de dados mundiais (Dados processados em sequenciador Illumina).

Classificação taxonômica	Micro-organismos identificados	Número de sequências
superkingdom	Unknown	90613
superkingdom	Bacteria	67043
superkingdom	Eukaryota	3213
superkingdom	Archaea	1201
phylum	Proteobacteria	20188
phylum	Actinobacteria	15882
phylum	Acidobacteria	3365
phylum	Firmicutes	2314
phylum	Planctomycetes	2265
phylum	Chloroflexi	1446
phylum	Bacteroidetes	1380
phylum	Verrucomicrobia	1128
phylum	Cyanobacteria	800
phylum	Chordata	722
phylum	Thaumarchaeota	601
phylum	Ascomycota	595
phylum	Streptophyta	478
phylum	Gemmatimonadetes	329
phylum	Euryarchaeota	329
phylum	Nitrospirae	228
phylum	Basidiomycota	219
phylum	Deinococcus-Thermus	217
phylum	Arthropoda	148
phylum	Chlorophyta	129
phylum	Spirochaetes	109
phylum	Bacillariophyta	57
phylum	Nematoda	56
phylum	Crenarchaeota	55
phylum	Apicomplexa	52
phylum	Chlorobi	43
phylum	Chlamydiae	41
phylum	Phaeophyceae	30
phylum	Thermotogae	21
phylum	Poribacteria	21
phylum	Synergistetes	20
phylum	Aquificae	19
phylum	Ignavibacteria	17
phylum	Fusobacteria	16
phylum	Nitrospirae	16
phylum	Echinodermata	11
phylum	Cnidaria	10
phylum	Thermodesulfobacteria	9
phylum	Dictyoglomi	9
phylum	Annelida	7
class	Actinobacteria	11758
class	Alphaproteobacteria	7926
class	Deltaproteobacteria	1615
class	Planctomycetia	1564
class	Betaproteobacteria	1544
class	Gammaproteobacteria	1162
class	Bacilli	791
class	Solibacteres	678
class	Acidobacteriia	391
class	Clostridia	370
class	Verrucomicrobiae	353
class	Ktedonobacteria	257
class	Sphingobacteriia	238
class	Chloroflexi	229
class	Gemmatimonadetes	168

class	Cytophagia	140
class	Spartobacteria	133
class	Thermomicrobia	123
class	Nitrospira	117
class	Deinococci	89
class	Opitutae	80
class	Flavobacteriia	76
class	Sordariomycetes	69
class	Bacteroidia	66
class	Eurotiomycetes	57
class	Spirochaetia	41
class	Dothideomycetes	34
class	Halobacteria	33
class	Methanomicrobia	27
class	Chlamydia	26
class	Liliopsida	25
class	Negativicutes	24
class	Mammalia	23
class	Caldilineae	21
class	Agaricomycetes	17
class	Anaerolineae	17
class	Chlorobia	15
class	Epsilonproteobacteria	14
class	Insecta	13
class	Thermoprotei	10
order	Actinomycetales	9595
order	Rhizobiales	4422
order	Planctomycetales	1352
order	Myxococcales	965
order	Burkholderiales	953
order	Solirubrobacterales	678
order	Bacillales	660
order	Solibacterales	447
order	Rhodospirillales	341
order	Acidobacteriales	265
order	Rhodobacterales	259
order	Sphingomonadales	254
order	Verrucomicrobiales	251
order	Sphingobacteriales	203
order	Clostridiales	198
order	Nitroso-sphaerales	192
order	Ktedonobacteriales	174
order	Xanthomonadales	150
order	Chloroflexales	139
order	Pseudomonadales	120
order	Caulobacteriales	110
order	Gemmatimonadales	109
order	Cytophagales	109
order	Acidimicrobiales	106
order	Nitrospirales	78
order	Desulfuromonadales	62
order	Chromatiales	56
order	Flavobacteriales	56
order	Bacteroidales	56
order	Sphaerobacterales	56
order	Alteromonadales	51
order	Oscillatoriales	47
order	Rubrobacterales	43
order	Chroococcales	43
order	Nitrosopumilales	37
order	Desulfovibrionales	34

order	Rhodocyclales	34
order	Enterobacteriales	30
order	Syntrophobacterales	30
order	Deinococcales	28
family	Bradyrhizobiaceae	2061
family	Planctomycetaceae	1236
family	Streptomycetaceae	777
family	Micromonosporaceae	630
family	Mycobacteriaceae	495
family	Pseudonocardiaaceae	429
family	Bacillaceae	357
family	Nocardioideaceae	318
family	Solibacteriaceae	289
family	Burkholderiaceae	247
family	Conexibacteriaceae	236
family	Acidobacteriaceae	232
family	Polyangiaceae	218
family	Frankiaceae	205
family	Sphingomonadaceae	184
family	Rhizobiaceae	173
family	Phyllobacteriaceae	171
family	Rhodospirillaceae	153
family	Nocardiaaceae	146
family	Comamonadaceae	142
family	Methylobacteriaceae	137
family	Ktedonobacteraceae	135
family	Verrucomicrobia subdivision 3	132
family	Geodermatophilaceae	132
family	Rhodobacteraceae	131
family	Paenibacillaceae	122
family	Micrococcaaceae	120
family	Xanthomonadaceae	120
family	Nitrososphaeraceae	118
family	Hyphomicrobiaaceae	118
family	Myxococcaaceae	117
family	Caulobacteraceae	91
family	Acetobacteraceae	81
family	Microbacteriaceae	78
family	Pseudomonadaceae	73
family	Chloroflexaceae	73
family	Gordoniaceae	67
family	Xanthobacteraceae	66
family	Intrasporangiaceae	66
family	Acidimicrobiaceae	66
genus	Bradyrhizobium	873
genus	Streptomyces	597
genus	Mycobacterium	422
genus	Bacillus	279
genus	Frankia	132
genus	Burkholderia	118
genus	Arthrobacter	93
genus	Paenibacillus	75
genus	Mesorhizobium	70
genus	Candidatus Solibacter	69
genus	Gemmata	68
genus	Actinoplanes	67
genus	Rhizobium	61
genus	Micromonospora	58
genus	Methylobacterium	56
genus	Rhodococcus	56
genus	Gordonia	56



Tabela 06: Categorias de 120 mil sequencias de DNA metagenômico de solo sob cultivo de cana-de-açúcar pelo WebCarma em confronto com os bancos de dados mundiais (Dados processados em sequenciador Illumina).

<b>Acesso</b>	<b>Classificação</b>	<b>Função</b>	<b>Genes</b>
GO:0005524	ATP binding	molecular_function	2893
GO:0008152	metabolic process	biological_process	2469
GO:0016020	membrane	cellular_component	2354
GO:0016491	oxidoreductase activity	molecular_function	2136
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	biological_process	2055
GO:0003824	catalytic activity	molecular_function	2026
GO:0003677	DNA binding	molecular_function	1960
GO:0006810	transport	biological_process	1385
GO:0005622	intracellular	cellular_component	1323
GO:0003700	transcription factor activity	molecular_function	1165
GO:0006412	translation	biological_process	1151
GO:0005215	transporter activity	molecular_function	1123
GO:0009055	electron carrier activity	molecular_function	1008
GO:0055114	oxidation reduction	biological_process	1003
GO:0016021	integral to membrane	cellular_component	954
GO:0005737	cytoplasm	cellular_component	872
GO:0008270	zinc ion binding	molecular_function	769
GO:0006508	proteolysis	biological_process	763
GO:0005576	extracellular region	cellular_component	756
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	biological_process	688
GO:000160	two-component signal transduction system (phosphorelay)	biological_process	613
GO:0003735	structural constituent of ribosome	molecular_function	602
GO:0005840	ribosome	cellular_component	594
GO:000156	two-component response regulator activity	molecular_function	525
GO:000166	nucleotide binding	molecular_function	499
GO:0005634	nucleus	cellular_component	472
GO:0009058	biosynthetic process	biological_process	466
GO:0016787	hydrolase activity	molecular_function	459
GO:0003723	RNA binding	molecular_function	442
GO:0005525	GTP binding	molecular_function	415
GO:0006352	transcription initiation	biological_process	394
GO:0016987	sigma factor activity	molecular_function	379
GO:0046872	metal ion binding	molecular_function	368
GO:0030170	pyridoxal phosphate binding	molecular_function	368
GO:0005515	protein binding	molecular_function	316
GO:0007165	signal transduction	biological_process	315
GO:0009405	pathogenesis	biological_process	310
GO:0043565	sequence-specific DNA binding	molecular_function	301
GO:0004812	aminoacyl-tRNA ligase activity	molecular_function	300
GO:0051287	NAD or NADH binding	molecular_function	293