

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**METAGENOMA PARA PROSPECÇÃO DE ENZIMAS E
PRODUTOS DE INTERESSE NO BIOCONTROLE DE
FITOPATÓGENOS**

**Sonia Villamizar Cancelado
Tecnóloga Ambiental**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**METAGENOMA PARA PROSPECÇÃO DE ENZIMAS E
PRODUTOS DE INTERESSE NO BIOCONTROLE DE
FITOPATÓGENOS**

**Sonia Villamizar Cancelado
Tecnóloga Ambiental**

**Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro**

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

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: METAGENOMA PARA PROSPECÇÃO DE ENZIMAS E PRODUTOS DE INTERESSE NO BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS

AUTORA: SONIA VILLAMIZAR CANCELADO

ORIENTADORA: LUCIA MARIA CARARETO ALVES

COORIENTADOR: DANIEL GUARIZ PINHEIRO

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


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


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


Prof. Dra. MARIA BENINCASA VIDOTTI
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP


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


Pós-Doutoranda TEREZA CRISTINA LUQUE CASTELLANE
Departamento de Tecnologia / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de novembro de 2017

V715m Villamizar Cancelado, Sonia
Metagenoma para prospecção de enzimas e produtos de
interesse no biocontrole de fitopatógenos / Sonia Villamizar
Cancelado. -- Jaboticabal, 2017
v, 97 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves
Banca examinadora: Rodrigo Matheus Pereira, Maria Benincasa
Vidotti, Everlon Cid Rigobelo, Teresa Cristina Luque Castellane
Bibliografia

1. Fitases. 2. Celulases. 3. Moléculas bioativas. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:632

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

SONIA VILLAMIZAR CANCELADO – filha de MARIA AGRIPINA CANCELADO NIÑO e de CARLOS VILLAMIZAR MORENO. Nascida na cidade de Bucaramanga (Santander-Colômbia), em 16 de janeiro de 1984. Em fevereiro de 2006, iniciou o curso de Tecnologia Ambiental obtendo o título de Tecnóloga Ambiental pelas Unidades Tecnológicas de Santander (Colômbia) no ano de 2010. Em 2012 ingressou no 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), defendendo sua dissertação de mestrado em febrero de 2014. E no mesmo ano, iniciou o curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e de Plantas (Departamento de Tecnologia). Em novembro de 2017 defendeu sua tese de doutoral em Microbiologia Agropecuária.

A todos mis seres queridos, especialmente

..... A mi amadísimo esposo Juan Carlos Caicedo, quien ha sido esencia, impulso y pilar principal en culminación de este propósito y de muchos otros en mi vida, además de brindarme su apoyo constante y amor incondicional, siendo mi mejor amigo, mi compañero inseparable, mi consejero, mi cómplice.... fuente de sabiduría y calma en los momentos cruciales de mi vida. Te amo.

..... A mis padres María (in memoriam) y Carlos por toda su bondad y sacrificios sin pedir nada a cambio. Son ustedes a quienes debo toda la persona que soy. Gracias por su guía y ejemplo durante todos los años de mi vida. Los quiero muchísimo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves, minha orientadora, pela oportunidade cedida, proporcionando meu desenvolvimento pessoal e profissional, pela confiança, dedicação, paciência e ensinamentos durante esses anos, cruciais para minha formação.

Aos Professores Dr. Jesus Aparecido Ferro e Dra. Maria Ines Tiraboshi Ferro pela oportunidade, por abrir as portas do LBM e ser como anjos verdadeiros, devo muito a vocês, eternamente grata.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro pelo auxílio, ensinamentos e paciência, muito obrigado por contribuir para o meu crescimento profissional.

A todo o pessoal do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas (LBMP) e do Laboratório de Biologia Molecular (LBM).

À todas as pessoas que fizeram parte direta ou indireta da realização deste projeto, cuja lista seria interminável, pois cada pessoa que conheci no transcorrer de este propósito gerou seu aporte.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

A todos, minha mais profunda gratidão!!!!

*“As palavras nunca alcançam quando o que você
tem a dizer vai além da alma”
Julio Cortazar*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	11
1. Introdução.....	11
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1 O solo	14
2.2 Diversidade de microrganismos no solo.....	15
2.3 O processo de compostagem de matéria orgânica	17
2.4 Microbiologia da compostagem.....	18
2.5 Ferramentas para o estudo de microrganismos ambientais.....	19
2.5.1 Métodos dependentes da cultura.....	19
2.5.2 Métodos independentes de cultura.....	20
2.6 Metagenômica.....	23
2.6.1 Plataformas de sequenciamento para metagenômica.....	26
2.6.2 Estratégias para o estudo de amostras metagenômicas.....	30
2.6.3 Metagenômica aplicações biotecnológicas.....	32
2.7 Citricultura no Brasil.....	39
CAPÍTULO 2 – Prospecção metagenômica para detecção genes de interesse biotecnológico em amostras solo sob efeito de composto orgânico	
Resumo	50
Abstract	51
Introdução.....	52
Material e métodos	56
Amostragem	56
Extração do DNA metagenômico e sequenciamento	57
Processamento e análises das sequências obtidas	58
Resultados e discussão	59

Conclusão.....	73
Referências bibliográficas	73
CAPITULO 3 - Bactericidal effect of entomopathogenic bacterium	
Pseudomonas entomophila against Xanthomonas citri reduce citrus canker disease severity	
Abstract	79
Introduction	80
Materials and Methods	82
Soil Sampling	82
Metagenomic DNA extraction, sequencing and functional screening.....	83
Isolation and characterization of bactéria.....	83
Antibacterial ability against <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> <i>in vitro</i> and <i>in plant</i> assays.....	84
MIC and MBC determination	86
Extraction, purification and characterization of putative bioactive compound.....	86
Results	87
Metagenomic sequencing and functional screening.....	87
Isolation and characterization of Pseudomonas bactéria.....	87
MIC and MBC for <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306.....	90
<i>In planta</i> antibacterial activity against Xcc 306.....	91
Identification of putative bioactive compound.....	93
Discussion	93
Literature Cited.....	96

METAGENOMA PARA PROSPECÇÃO DE ENZIMAS E PRODUTOS DE INTERESSE NO BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Resumo - O repertório de enzimas derivadas de microrganismos, com aplicações medicinais, agrícolas e industriais, assim como os produtos naturais provindos de microrganismos encontrasse grandemente limitado. Devido a que, a ampla maioria dos microrganismos ambientais são não cultiváveis, o que faz essa rica fonte permanecer relativamente inexplorada. Hoje a metagenômica, pode proporcionar acesso independente de cultivo, no estudo da diversidade populacional e seu potencial funcional. O solo é um dos principais reservatórios da diversidade microbiana e, provavelmente o ambiente mais desafiante para o estudo; pois abrange várias populações com múltiplas relações de interdependência. Por outro lado, o compostagem que é a conversão biológica de material orgânico num produto final estabilizado, é usado como um aditivo para a adubação do solo. O processo de compostagem, é mediado pela complexidade da comunidade bacteriana residente, e sua alta plasticidade metabólica. Consequentemente, solos adubados com o mesmo, são uma fonte altamente conveniente, para o isolamento e identificação de microbiota produtora de enzimas para diversas aplicações biotecnológicas.

No presente trabalho aborda-se uma análise metagenômica, na identificação de enzimas de interesse biotecnológico, particularmente as celulasas e as fitases e, moléculas com atividade antibiótica (fenazinas). E sob outra perspectiva, o isolamento de bactérias com potencial atividade bactericida frente a microrganismos fitopatogênicos.

Palavras chave: Fitases, celulasas, moléculas bioativas, controle biológico.

METAGENOMIC APPROACH FOR ENZYMES PROSPECTION AND INTERESTING PRODUCTS IN PHYTOPATHOGENS BIO –CONTROL.

ABSTRACT- The collection of enzymes derived from microorganisms, with medicinal, agricultural and industrial applications, as well as natural products from microorganisms, it has been greatly limited. Because the vast majority of environmental microorganisms are non-cultured, this rich source remains relatively unexplored. Currently the Metagenomic can provide independent culture approach to study of population diversity and its functional potential. Soil is one of the main reservoirs of microbial diversity and probably the most challenging environment for the study; because it encompasses several populations with multiple interdependence relationships. On the other hand, composting, which is the biological conversion of organic material into a stabilized final product, is used as an additive for soil fertilization. The composting process is facilitated by complex community of the resident bacterial, and its high metabolic plasticity. Consequently, soils fertilized with compost are a highly convenient source, for the isolation and identification of microbiota producing enzymes for various biotechnological applications. The present work addresses a metagenomic analysis for the identification of enzymes of biotechnological interest, particularly celluloses, phytases, and molecules with antibiotic activity (phenazines), also as well, the isolation of bacterial strains with potential bactericidal activity against phytopathogenic microorganisms

Keywords: Biological control, Celluloses, Phytases, Bioactive molecules

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O solo é um sistema biológico complexo e dinâmico, onde os microrganismos degradam praticamente todos os compostos orgânicos, incluindo xenobióticos persistentes e compostos polifenólicos naturais. Além disso, os microrganismos são capazes de influenciar na produtividade vegetal dos ecossistemas terrestres e manter os ciclos biogeoquímicos. (NANNIPIERI et al., 2017). A comunidade microbiana do solo é altamente complexa, sendo possivelmente o nicho com o maior nível de diversidade procariótica; segundo Torsvik e colaboradores (1996) calcula-se que, por grama de solo, existam perto de 6000 genomas bacterianos diferentes, tomando como referência o tamanho do genoma de *Escherichia coli*. O que possibilita uma imensa fonte de genes de interesse biotecnológico e farmacêutico.

Essa diversidade apresenta um enorme recurso genético e biológico em grande parte inexplorado, que pode ser estudado para desvendar novos genes, vias metabólicas e seus produtos e diversas aplicações. Portanto, microrganismos de ambientes naturais são presumivelmente, uma rica fonte de novos biocatalisadores e, virtualmente camuflam uma vasta e desmesurada riqueza ainda não aproveitada (DOUGHERTY et al., 2012). Por outro lado, dado que menos de 1% desta diversidade é cultivável por técnicas tradicionais, a utilização de abordagens metagenômicas, pode contribuir para elucidar esta problemática (DELMONT et al., 2011; SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003).

O termo Metagenômica, foi definido como a análise independente de cultura baseado na sequência e função dos genomas microbianos coletivos presentes num ambiente, o vocábulo foi cunhado por Handelsman *et al.* (1998), com uma noção para analisar uma coleção de elementos semelhantes, mas não idênticos, conforme no conceito estatístico de meta-análise. A metagenômica é uma tecnologia chave para explorar os DNAs de microrganismos ainda não cultivados em seus habitats naturais, complementando as abordagens baseadas em cultura. Teoricamente, o DNA

microbiano isolado a partir de uma amostra ambiental representa o DNA coletivo de todos os microrganismos nativos, dependendo da comunidade microbiana analisada, podem possuir desde várias centenas até vários milhares de espécies e genomas diferentes, num único metagenôma. Esta metodologia possibilita o estudo dos genomas inteiros num determinado ambiente, diretamente a partir das amostras sem precisar de técnicas para isolamento e cultura dos microrganismos (BRADY et al., 2002). Deste modo, o principal objetivo da metagenômica é explorar a biodiversidade quase ilimitada, da ampla maioria dos microrganismos não cultiváveis. Por conseguinte, os estudos metagenômicos tornam possível o conhecimento de organismos e genes que permanecem ocultos pelo uso de técnicas de cultivo tradicionais (GILBERT e DUPONT, 2011).

Além da identificação de novas biomoléculas, a metagenômica provou ser uma ferramenta poderosa para explorar a ecologia, o perfil metabólico e a comparação de comunidades microbianas complexas. O perfil das funções codificadas por uma comunidade microbiana e não os tipos de organismos que as produzem fornece um meio para distinguir amostras ambientais, com base nas funções selecionadas pelo ambiente local e revelando aspectos sobre os recursos desse ambiente (STREIT W. R. e DANIEL R., 2010).

Toda a diversidade microbiológica, presente nos diferentes nichos ecológicos, considera-se uma fonte importante de ferramentas para a aplicação em processos biotecnológicos. O composto, produto do processo de compostagem de resíduos sólidos, tornou-se nicho de grande interesse na procura de enzimas, genes, vias metabólicas e, compostos bioativos, de aplicação biotecnológica. A compostagem permite a transformação e saneamento de uma grande variedade de resíduos orgânicos, utilizando o potencial metabólico dos microrganismos, de bactérias, bem como de fungos e arqueias, para converter o material de partida (resíduos orgânicos), num produto estabilizado. Neste processo os resíduos orgânicos são biologicamente degradados por microrganismos, através da decomposição microbiana acelerada em condições aeróbias. Isto ocorre sob uma combinação de qualidades ambientais adequadas e um período de tempo de ajustado que gera um produto final rico em nutrientes. Esse material

semelhante ao húmus e chamado de composto e regularmente é usado como um condicionador do solo (EPSTEIN, 1997; GLAZER A.N. e NIKAIDO, 1995). A grande disponibilidade nutricional que fornece o composto, favorece a presença de espécies bacterianas catadoras oportunistas, como as Pseudomonadales (CANCELADO et al., 2014). Estas bactérias usam como estratégia principal, para garantir a sua adaptação, defesa e competitividade, a produção e excreção de metabólitos secundários no ambiente externo e, tem despertado grande interesse na pesquisa mundial em virtude de suas potenciais aplicações biotecnológicas.

Em concordância com a técnica de compostagem descrita acima, a Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) transforma os resíduos vegetais e animais gerados no Parque Zoológico São Paulo, com a finalidade de dar cumprimento a Sistema de Gestão Ambiental (SGA) implementado na instituição. Estudos metagenômicos recentes do composto produzido na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), revelam que as operações da compostagem poderiam ser uma mina para a prospecção de enzimas de degradação de biomassa; assim como de novos microrganismos e enzimas termostáticas de grande utilidade em remediação ambiental, controle biológico e tecnologias industriais (ANTUNES et al., 2016). Conseqüentemente, no presente trabalho o objeto de estudo é um solo da horta da fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), onde se emprega o composto orgânico produzido. Por isto, o estudo desse ambiente pode resultar na recuperação de microrganismos, genes e enzimas importantes em diferentes processos biotecnológicos.

Outro aspecto importante a ser considerado diz respeito à citricultura no Brasil. Essa área produtiva gera empregos diretos e indiretos no país com uma massa salarial anual entorno de R\$ 676 milhões. A citricultura é um dos setores mais preponderantes do agronegócio, sendo o Brasil o maior produtor de suco de laranja no mundo e exportando 98% da sua produção. Entretanto, o parque citrícola de São Paulo e do Triângulo Mineiro, tiveram que fazer erradicação de 39 milhões de árvores na última década, pelo aparecimento de doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos, os que provocaram extensos danos aos citros. Destacando-se a doença do cancro

cítrico, cujo agente etiológico é bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). A qual afeita quase todos os tipos de culturas cítricas comercialmente importantes, implicando significativas perdas de produção, principalmente para os cultivos de citros em larga escala (NEVES et al., 2010; STARR 1981; JANSSON et al., 1975; BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Tendo em consideração as razões anteriormente expostas e dado que o solo da horta utilizado para o desenvolvimento do estudo, possui um grande potencial microbiano a serem explorado, o presente trabalho aborda uma análise metagenômica, na identificação de enzimas de interesse biotecnológico e, sob outra perspectiva, o isolamento de bactérias com potencial de inibir crescimento de bactérias fitopatogênicas.

2. Revisão de Literatura

2.1 O solo

A fina camada superficial que cobre a Terra e, atua como uma interface entre a atmosfera e a litosfera é o que se conhece como solo. É uma matriz complexa formada por três componentes importantes: (i) um agregado de partículas minerais de vários tamanhos e diferentes composições químicas, dividido em três tipos: areias, argilas e limos; (ii) componentes orgânicos nos diferentes estádios de sua decomposição; e (iii) o componente biológico que compreende bactérias, fungos, leveduras e também plantas de raízes. As percentagens dos três componentes minerais e a matéria orgânica são organizadas a nível micro e macro em agregados determinando a textura e estrutura do solo (ROBE et al., 2003; NEEDELMAN, 2013). Assim sendo, a quantidade de matéria orgânica é, sem dúvida, um dos melhores indicadores de qualidade agrônômica e fertilidade de um solo, acima de ser o habitat de uma grande diversidade de organismos (KASSAM e FRIEDRICH, 2011).

Segundo Nogales e colaboradores (2005), o tipo de composição do material mineral esta dado pelas características das rochas do subsolo, apoiados nos processos edáficos que ocorreram na sua formação. Esta

parcela inorgânica está intimamente relacionada à disponibilidade de nutrientes, retenção de água, etc. Contudo a gênese do solo é principalmente o resultado de fatores como matéria parental, clima, biota, topografia e tempo; sendo estes altamente interativos (PAUL, 2006).

Neste cenário, os microrganismos são distribuídos de forma heterogênea dentro de micro-agregados e em macro-porosidades. Além disso, eles aderem ou adsorvem fortemente em partículas de solo através de uma variedade de mecanismos de ligação (BAKKEN e LINDAHL, 1995; RANJARD et al., 1998; KIM e CROWLEY, 2013).

2.2 Diversidade de microrganismos no solo

O solo é considerado um dos principais reservatórios da diversidade microbiana e, provavelmente o ambiente mais desafiante para o estudo. Pois compreende vários elementos com múltiplas relações de interdependência, devido à alta diversidade de espécies microbianas que o habitam. Conseqüentemente suas comunidades possuem uma ampla alternativa de genes para a degradação ou transformação de compostos orgânicos. Estima-se que um grama de solo florestal contenha 4×10^7 células procarióticas, enquanto que um grama de solo agrônômico ou de pastagem contém 2×10^9 células (MOCALI e BENEDETTI, 2010; PAUL, 2006). Representando um ambiente extremamente promissor, para a descoberta de novas capacidades metabólicas e determinantes genéticos que poderiam ser aplicados na indústria de biotecnológica. De acordo com Torsvik e colaboradores (1996), estudos de associação de DNA extraído de diferentes genomas procarióticos, estimaram que existem entre 2.000 e 18.000 genomas por grama de solo; valor que pode ser subestimado, uma vez que tais análises dificilmente consideram os genomas de espécies raras ou difíceis de acessar.

Portanto, as análises dão uma ideia apenas preliminar do grau de diversidade de procariotas presentes em um grama de solo, possivelmente excedendo a diversidade conhecida e descrita no catálogo de procariotas do Centro de Informações Biotecnológicas (NCBI).

Ao contrário dos habitats aquáticos, as superfícies do solo sofrem mudanças dramáticas no teor do conteúdo da água, desde saturação até seca extrema. Essas mudanças drásticas sobre a população microbiana podem resultar em a perda duma fração da comunidade microbiana durante cada ciclo de inundação e seca (KIEFT e FIRESTONE, 1987; RUI et al., 2017). Sendo assim, a composição da comunidade microbiana do solo flutua. Além disso, na estrutura complexa do solo, os microrganismos geralmente estão ligados a partículas do mesmo, como grãos de areia ou complexos de matéria orgânica e argila gerando um nível de heterogeneidade de habitats, que é determinado pela quantidade da umidade mantida e a conformação dos gradientes de disponibilidade de água e nutrientes nestes micro-habitats (HASSINK et al., 1993; KONG et al., 2011). Dado que a matéria orgânica é a principal fonte de carbono e nitrogênio para microrganismos e pode variar em quantidade e composição química. Portanto é dependente de fatores como: tipo de vegetação, clima, material parental do solo, nível de drenagem e a atividade dos microrganismos presentes (BARDGETT, 2005; KONG et al., 2011; TOTSCHE et al., 2017).

Os estudos de ecologia microbiana têm contribuído para uma melhor compreensão da estrutura das comunidades microbianas, particularmente aos efeitos das variações ambientais (climáticas, bióticas, xenobióticas). No entanto, ainda existem desafios metodológicos para a análise da diversidade microbiana em ambientes de extrema complexidade, como o solo. A implementação de técnicas *Omicas* tem contribuído grandemente para estudos atuais de dinâmicas funcionais microbianas em solos e outros ambientes complexos (JANSSON et al., 2012). De fato, os organismos do solo comumente não são distribuídos aleatoriamente, porém apresentam padrões previsíveis em diferentes escalas espaciais. No entanto, ainda existem desafios metodológicos para a análise da diversidade microbiana em ambientes de extrema complexidade, como o solo (JANSSON et al., 2012; NEEDELMAN, 2013; TOTSCHE et al., 2017).

A biodiversidade de um ambiente ou habitat é estudada no âmbito da ecologia microbiana, visando estabelecer a composição de uma comunidade. Bem como, para analisar o que os diferentes componentes duma comunidade

fazem e, como eles interagem uns com os outros. Igualmente com o interesse em revelar propriedades emergentes de um ecossistema, capacidades que não são manifestadas por microrganismos isolados, mas se, em todo um consórcio (YOUNG et al., 2008; KONOPKA, 2009; TOTSCHE et al., 2017).

Nos estudos das comunidades microbianas, foram definidos três níveis de diversidade. A diversidade alfa, se refere à diversidade de um habitat, ou seja, intrínseca de cada comunidade. A diversidade beta definida como a variação na composição das espécies entre os sítios de uma região ou área de interesse. E por último, a diversidade gama encarregada das análises de diversidade em grande escala, combinando componentes da alfa e beta diversidade (WHITTAKER, 1972; MACALADY, 2013).

2.3 O processo de compostagem de matéria orgânica

A compostagem imita o processo natural de decomposição (HAIGHT, 2001) de forma acelerada. Este processo requer o aporte de matéria orgânica, minerais, água e microrganismos. O material orgânico é processado em uma pilha ou leiras e libera calor, água e CO₂, em forma dependente de oxigênio (BERNAL et al., 2009).

O processo de compostagem é caracterizado por aumentos e diminuições de temperatura onde podem ser diferenciadas pelo menos duas fases. A primeira fase chamada de decomposição, conduzindo um processo exotérmico onde moléculas complexas são degradadas em moléculas orgânicas e inorgânicas simples pela atividade biológica. A fase de decomposição consiste em dois estágios: o mesofílico com temperaturas entorno de 37° C, e o termofílico com temperaturas chegando até 70° C. A segunda fase é a de maturação também é constituída por duas etapas, uma de resfriamento, com temperaturas que variam desde 40° C até à temperatura ambiente, e uma de estabilização, caracterizado por baixa atividade microbiana (SOLIVA, 2001; COOPERBAND, 2002; HAIGHT, 2000).

A técnica da compostagem é baseada na atuação de diversos microrganismos aeróbios (HAUG, 1993), os que agem de maneira sucessiva sobre o material orgânico de partida, dependendo da influência de fatores

como temperatura, umidade, pH, aeração e relação Carbono / Nitrogênio (C/N) principalmente. Estes fatores devem ser controlados para assegurar a produção de temperaturas elevadas, redução do volume e peso dos resíduos, e crescimento microbiano apropriado, portanto, resultando numa adequada mineralização da matéria orgânica (CRONJE et al., 2003; NAKASAKI, 2005).

Num processo de compostagem os responsáveis pela transformação são os microrganismos, portanto todos os fatores que podem restringir o seu desenvolvimento também vão limitar o próprio processo. Para conseguir esta transformação sob condições controladas é necessário que parâmetros como: temperatura, umidade, aeração, pH e relação carbono e nitrogênio (C/N), sejam monitorados durante o processo pois, são indispensáveis para os microrganismos desenvolverem-se de maneira ótima (TIQUIA, 2005; MORENO et al., 2008; EPSTEIN, 2011).

2.4 Microbiologia da compostagem

Existem muitos estudos sobre a estrutura da comunidade microbiana, no processo de compostagem. A maioria deles concentra-se nas bactérias responsáveis pela degradação da matéria orgânica. Na identificação dos microrganismos presentes no processo de compostagem, além da técnica de isolamento clássico, abordagens baseadas em técnicas independentes da cultura, como a extração de DNA e a amplificação do gene 16S rRNA, são comumente usados (CHADNA et al., 2013), bem como análises metagenômicos (ANTUNES et al., 2016).

Tanto bactérias quanto fungos estão presentes e ativos num processo típico de compostagem (DE GANES et al., 2013). Os principais grupos bacterianos no início do processo de compostagem são as bactérias mesófilas, tais como *Lactobacillus* spp. e *Acetobacter* spp produtoras de ácidos orgânicos (GALUKE, 1954). Posteriormente, no estágio termofílico, bactérias Gram-positivas, como *Bacillus* spp. e *Actinobacteria*, podem tornar-se dominantes (DE BERTOLLI et al., 1980). No entanto, tem sido observado que o processo de compostagem mais eficaz é conseguido por comunidades mistas de bactérias e fungos (DE GANES et al., 2013).

O estudo da microbiologia da compostagem (ICHIDA et al., 2001) envolve três conjuntos definidos: (i) A microbiologia de auto-aquecimento da matéria orgânica úmida: este fenômeno, muito cedo levou ao conceito de geração de calor como parte do metabolismo microbiano e foi extensivamente estudado em solos de produção agrícola. (ii) A microbiologia de compostagem é de alguma forma relacionada com a microbiologia do solo e decomposição, a fertilidade do solo, o volume de matéria orgânica na natureza e a formação de substâncias húmicas. (iii) A microbiologia para o controle de agentes patogênicos em resíduos a serem degradados. Isso é, o fato da eliminação de agentes patogênicos nas unidades de compostagem, assim como, o potencial risco de transmitir agentes causadores de doenças em plantas e animais. Da mesma maneira que, a capacidade do composto para atuar como controlador de agentes patogênicos em plantas.

2.5 Ferramentas para o estudo de microrganismos ambientais

2.5.1 Métodos dependentes da cultura

No século XIX com a invenção do microbiologista alemão Julius Richard Petri e a introdução de culturas sólidas em placas de Petri, logro-se a descoberta de uma grande diversidade microbiana. Além disso, a utilização de meios de cultura enriquecidos, permitiu o isolamento de microrganismos com características desejadas, devido as condições seletivas e diferenciais dos meios. Entretanto, para alcançar culturas puras de microrganismos presentes na natureza, esforços contínuos são feitos com o objetivo de aumentar a probabilidade de isolamento. Na literatura, existe uma extensa lista de meios de cultura descritos, incluindo diferentes tipos de fontes de carbono, vitaminas, energia, entre outros, bem como considerações sobre fatores físico-químicos que afetam o crescimento, por exemplo, temperatura, pH, requisitos de oxigênio, salinidade, entre outros (SCHLOTTER; DILLY e MUNCH, 2003). Tradicionalmente essas técnicas são usadas para aceder a microbiota conhecida, mas também na procura de linhagens de

características particulares com o fim de ser aproveitados biotecnologicamente (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009).

Por outro lado, encontra-se a cultura de comunidades, concernente ao isolamento e ao cultivo dos consórcios microbianos a partir de um processo de seleção artificial. O que pode resultar na produção de uma comunidade complexa e vários componentes otimizados para desempenhar uma função específica. Estas metodologias dependentes da cultura são essenciais na definição de espécies e para a sua caracterização genotípica e fenotípica. Algumas das principais vantagens associadas a esta metodologia estão em seu custo econômico, relativamente baixo; além de que, o pesquisador possui o "material" microbiano para uso em estudos futuros (Al-AWADHI et al., 2013). Embora a principal desvantagem apresentada pelas metodologias dependentes da cultura seja a limitação na recuperação da maioria dos microrganismos presentes no meio ambiente, ademais, sabe-se que muitos dos microrganismos no ambiente são recalcitrantes à serem crescidos em condições padrão de laboratório (HEAD; SAUNDERS e PICKUP, 1998; Al-AWADHI H. et al., 2013).

2.5.2 Métodos independentes de cultura

A incapacidade de cultivar as bactérias presentes num habitat particular; bem como, os problemas inerentes na identificação fenotípica, como por exemplo: a presença de estirpes de uma mesma espécie, que podem gerar padrões diferentes em ensaios repetidos. Isto, porque nem todas as estirpes da mesma espécie apresentam características homogêneas. Estes inconvenientes têm sido parcialmente eliminados devido a possibilidade de isolar e caracterizar o material genético da comunidade microbiana que reside no referido ambiente. A partir do estudo dos genomas dos microrganismos contidos nas amostras é possível reconstruir a estrutura populacional da comunidade (YANG et al., 2007). O conjunto dos genomas dos microrganismos de uma determinada amostra ou habitat é chamado metagenoma (HANDELSMAN, 2004).

O desenvolvimento de técnicas para a extração de DNA ou RNA, de toda uma comunidade microbiana, a partir de amostras ambientais e sua análise possibilitou um maior conhecimento da diversidade e da interação nas comunidades microbianas (ALAM et al., 2006; DE LA CRUZ-LEYVA et al., 2011).

As técnicas para a extração de DNA são geralmente uma combinação de métodos físicos e químicos para quebrar as células, a fim de minimizar danos nos ácidos nucleicos. Os métodos para extração do DNA de metagenomas bacterianos de diferentes ambientes são divididos em dois grupos: lise direta das células contidas em uma suspensão buffer da amostra, seguida da separação do DNA do substrato e dos detritos celulares; ou lise indireta separando primeiro as células do substrato para posteriormente realizar a lise (HOLBEN et al., 1988; JACOBSEN e RASMUSSEN, 1992; BERRY et al., 2003).

Sendo a extração de DNA, um passo chave para abordagens metagenômicas; o rendimento de DNA isolado de diferentes tipos de solo, usando diversos protocolos pode variar de 1 µg a 500 µg de DNA por grama de solo (BERTRAND et al., 2005; FROSTEGÅRD et al., 1999; LAKAY et al., 2007; DELMONT et al., 2011). Delmont e colaboradores (2011), relatam no seu trabalho que ao fazer análises por pirosequenciamento, do DNA extraído do mesmo solo, em forma direta (alto rendimento, baixo tamanho de DNA) ou indiretamente (baixo rendimento e alto tamanho de DNA), o resultado na distribuição das sequências da maioria das funções metabólicas e espécies detectadas, foram estatisticamente semelhantes nas duas formas de extração do DNAs. Embora, o método indireto possa ter acessado numa diversidade genética do solo um pouco maior, apesar do baixo rendimento.

Os métodos precursores nas análises do perfil da diversidade genética bacteriana foram tecnologias eletroforéticas de pegadas genéticas, como DGGE (Gel Electroforese com Gradiente de Desnaturação), ARDRA (Análise Amplificada de Restrição de DNA Ribossomal), RFLP (Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição), RADP (Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico entre outras (CORTÉS-LÓPEZ et al, 2014).

Se bem que, a maioria das técnicas moleculares utilizadas para estudos de diversidade microbiana, baseiam-se na amplificação de uma sequência alvo mediante a PCR (Reação da Polimerase em Cadeia). A sequência mais utilizada é a do gene que codifica o ARN ribossômico, especificamente o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo bacteriano, 16S rRNA. Com base nas análises comparativas de rRNA, a vida celular foi classificada em três domínios primários: um eucariótico (Eucarya) e dois procarióticos (Bactérias e Archaea) (HUGENHOLTZ, 2002).

Este marcador molecular tem sido amplamente utilizado uma vez que: (i) está presente em todos os microrganismos e, tem a mesma função em todos eles; (ii) devido a restrições estruturais, diferentes regiões da molécula têm diferentes graus de variabilidade em sua sequência, permitindo comparações com diferentes níveis de resolução; (iii) a transmissão é principalmente vertical, considerando-se que não está sujeita à transferência horizontal de genes entre microrganismos; (iv) o comprimento de sua sequência é de tamanho adequado para fornecer informações suficientes e (v) as análises de sequências permitem reconstruções filogenéticas de microrganismos (TRINGE e HUGENHOLTZ, 2008). A amplificação de regiões específicas do gene 16S rRNA, o sequenciamento subsequente e a comparação das sequências com outras de referência dos bancos de dados, permite a identificação e o estabelecimento das relações genéticas entre organismos procarióticos.

Entretanto, Klindworth e colaboradores (2013), mostraram que as análises da amplificação do gene 16S rRNA, usando diversas tecnologias de sequenciamento (Illumina, Ion Torrent, Roche 454 e Pac Bio) continua sendo a abordagem padrão na pesquisa independente de cultura da diversidade microbiana. Porém a precisão dessas análises depende fortemente da escolha dos primers utilizados. Os vários primers comumente usados, apresentam diferenças significativas na cobertura geral e no espectro relacionado aos filos, entre os 175 primers e 512 pares de primers avaliados *in silico*, em relação ao conjunto de dados de referência não redundante SILVA 16S / 18S (SSURef 108 NR), apenas 10 podem ser recomendados.

Por outro lado, estudos realizados com reconhecimento dos genes biomarcadores funcionais possibilita estudar processos metabólicos específicos nas comunidades microbianas, como a fixação do nitrogênio, a oxidação do metano, a nitrificação, etc.

Ao longo das últimas décadas, o campo da ecologia microbiana tem experimentado enormes progressos, e uma ampla variedade de técnicas moleculares foram desenvolvidas para descrever e caracterizar a diversidade funcional e filogenética de microrganismos. A evolução metodológica das técnicas de isolamento e purificação dos ácidos nucleicos, sequenciamento e montagem de sequências, possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia alternativa: metagenômica.

Com o surgimento de tecnologias de sequenciamento de última geração (NGS), é possível determinar, a composição de microbiota, altamente complexa com maior precisão. Além de vincular a diversidade da comunidade microbiana com a função do nicho e, descobrir novos grupos de microrganismos em sistemas ambientais complexos (BARTRAM et al., 2011; FAKRUDDIN e MANNAN, 2012).

2.6 Metagenômica

A metagenômica é a análise de genomas microbianos coletivos, obtidos diretamente de amostras ambientais e, não depende do cultivo ou do conhecimento prévio das comunidades microbianas (RIESENFELD et al., 2004). A metagenômica também é conhecida por outros nomes, como genômica ambiental, genômica comunitária, ou eco-genômica microbiana. (RASTOGI e SANI, 2011). A análise metagenômica consiste no estudo de todos os genomas presentes num determinado ambiente, a partir do DNA extraído diretamente de amostras ambientais (HANDELSMAN, 2004; ZEYAUULLAH et al., 2009). Ao acessar diretamente o genoma coletivo, a metagenômica tem o potencial de dar uma visão abrangente da diversidade genética; composição de espécies; evolução e interações com o meio ambiente e, do potencial metabólico das comunidades microbianas em

ambientes naturais (SIMON e DANIEL, 2011; THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

Os primeiros passos na metagenômica do solo, consistiram na preparação de bibliotecas metagenômicas para acessar os genomas de microrganismos. Em ditas bibliotecas, o DNA metagenômico extraído é fragmentado por digestão enzimática de restrição ou clivagem mecânica e, clonado depois em vetores. A etapa de triagem dos clones é uma tarefa muito exaustiva porque, para ter uma representação robusta do metagenoma, o número de clones a serem avaliados é muito grande. O rastreamento pode ser funcional, expressando as sequências clonadas em organismos hospedeiros (por exemplo, em *Escherichia coli*); ou pode basear-se na inferência da função, sequenciando o fragmento de DNA clonado. As pesquisas em metagenômicas avançaram em vários ambientes como o solo, a atmosfera, o oceano. Proporcionando deste modo, acesso à diversidade filogenética e funcional de microrganismos não cultivados (HANDELSMAN, 2004). Por conseguinte, a metagenômica é crucial para a compreensão dos papéis bioquímicos de microrganismos não cultivados e sua interação com outros fatores bióticos e abióticos (HAMADY et al., 2009).

O primeiro trabalho de sequenciamento metagenômico em larga escala, estudou duas comunidades virais encontradas na água do mar superficial. Mais do que 65% das sequências virais encontradas neste estudo foram novas, sendo a população dominante responsável por apenas 2-3% das sequências geradas (BREITBART et al., 2002). Por outro lado, um dos primeiros projetos metagenômicos destacado foi realizado por Venter e colaboradores (2004), no qual analisaram-se populações microbianas nas águas superficiais do Mar dos Sargazos. Esse estudo permitiu a identificação de uma grande diversidade de novos genes putativos e até mesmo a montagem de genomas desconhecidos.

Apesar da geração de quantidades vastas de dados de sequência de Sanger apenas 25% das leituras conseguiu ser montadas. Enquanto os estudos metagenômicos pioneiros foram realizados usando a plataforma Sanger (BREITBART et al., 2002; TYSON et al., 2004), rapidamente foi reconhecido que esta tecnologia não poderia fornecer uma profundidade de

leitura suficiente para as análises das comunidades moderadamente diversas. No entanto, genomas parciais e quase concluídos foram recuperados utilizando sequenciamento Sanger de comunidades relativamente simples (TYSON et al., 2004).

Dada ausência na profundidade de sequenciamento, adequada para montagem de metagenômas, o uso de análises centradas nos genes constitui uma alternativa na determinação de resultados biológicos valiosos (BÉJÀ O et al., 2000). Como os estudos feitos para a possível identificação de novos genes degradadores da biomassa no rúmen das vacas (HESS et al., 2011). Além, das análises metagenômicas onde observou-se a seleção funcional de comunidades microbianas lignocelulolíticas (LEMOS et al., 2017). Esses estudos utilizaram o potencial metabólico de genes e genomas recuperados com baseados nas avaliações feitas no COG. Os que amostraram que codificam várias hidrolases de glicosídeos, bem como outros genes relacionados à degradação de lignocelulose.

Devido à complexidade da maioria dos metagenômas, têm-se estabelecidos novas técnicas de sequenciamento alto rendimento, mais sensíveis e eficientes, promovendo assim, um aumento substancial no número de estudos metagenômicos realizados, (PAGANI et al., 2012), por conseguinte possibilitando a identificação fiável de genes, que codificam e satisfazem os objetivos das pesquisas, a partir de metagenômas complexos. As avaliações destas bibliotecas metagenômicas têm sido baseadas em análise de sequências de nucleotídeos (abordagem baseada em sequência) ou em atividade metabólica (abordagem baseada em função). (VIEITES et al., 2010).

Apesar do elevado rendimento nos resultados das plataformas de última geração, as sequências não devem ser aproveitadas cegamente a uma amostra ambiental sem elaborar uma estratégia de sequenciamento apropriada. A estratégia utilizada, (plataformas únicas ou múltiplas, bibliotecas fragmentadas ou emparelhadas) deve levar em consideração tanto a questão de pesquisa como a composição da comunidade alvo. A falta de fazê-lo pode dificultar severamente os processos subsequentes e o sucesso geral do estudo metagenômico (Figura 1) (BRAGG e TYSON, 2014).

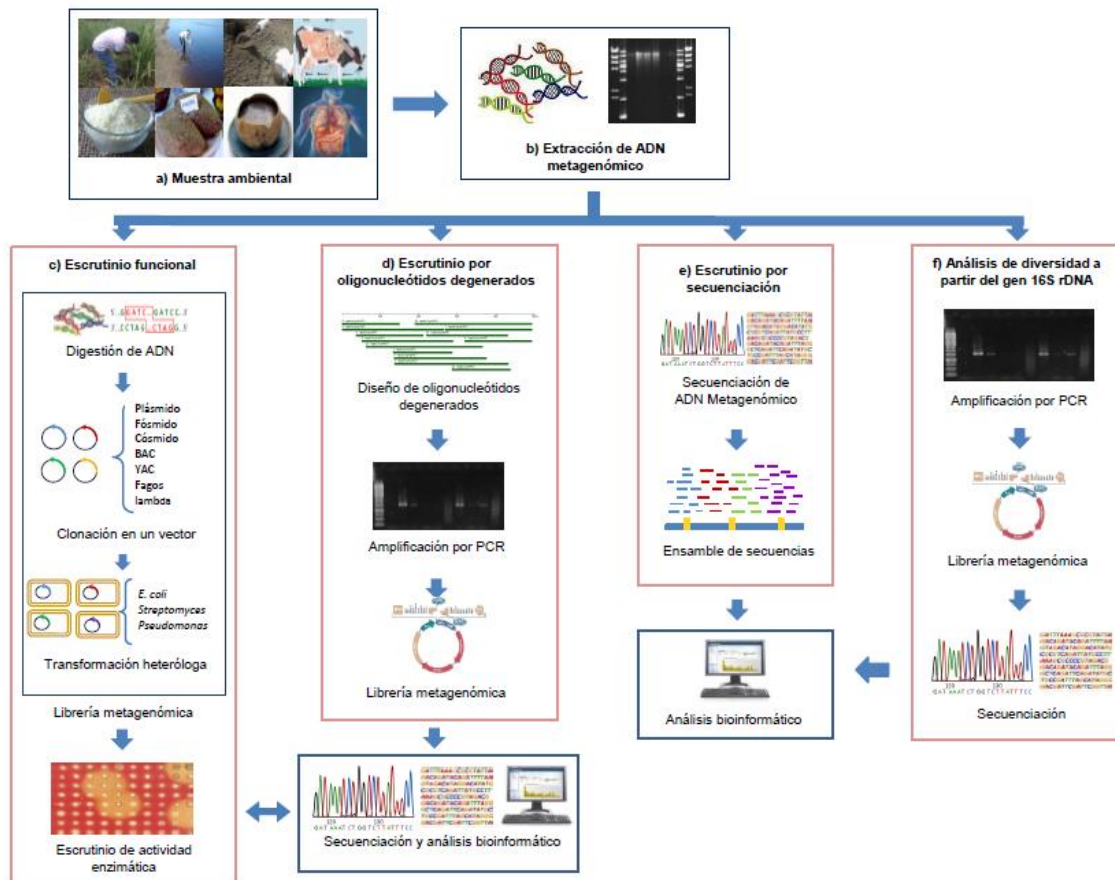


Figura1. Esquema de métodos para o estudo metagenômico de amostras ambientais (CORTÉS-LÓPEZ et al, 2014).

2.6.1 Plataformas de secuenciamento para metagenômica

Nos últimos anos, têm surgido uma série de novas tecnologias de sequenciamento aumentando a viabilidade de projetos metagenômicos. Essas tecnologias recentes, proporcionam sequenciamentos mais baratos; mais rápidos e de alto rendimento. A diversidade e a abundância não uniforme de comunidades microbianas, tornam o sequenciamento de alto rendimento, uma técnica essencial, para obter a cobertura adequada dos membros duma comunidade (BRAGG e TYSON, 2014).

- **Sequenciamento Sanger**

O sequenciamento do terminador de cadeia (frequentemente referido como sequenciamento "Sanger" por seu inventor, Frederick Sanger) foi uma das primeiras tecnologias de sequenciamento a serem desenvolvidas. Devido à facilidade de uso e à confiabilidade, o sequenciamento do Sanger, logo após tornou-se, padrão das tecnologias de sequenciamento. No entanto, existem limitações da técnica baseada em Sanger que são problemáticas para projetos de estudo metagenômico. O método de sequenciamento Sanger, pode apresentar algum tipo de viés biológico (HUSE et al., 2007), na medida em que o DNA forasteiro precisa ser clonado em um vetor bacteriano (*Escherichia coli*). Assim, o DNA forasteiro precisa ser compatível com a maquinaria de replicação de *E. Coli*. Além, de ser uma tecnologia de baixo rendimento. Portanto, os projetos metagenômicos baseados em Sanger são frequentemente limitados ao sequenciamento de bactérias ou comunidades microbianas de baixa diversidade ou a bibliotecas de cromossomas artificiais como fosmídeos ou cosmídeos entre outros (BRAGG e TYSON, 2014).

As tecnologias de sequenciamento da próxima geração superaram várias das desvantagens do sequenciamento do Sanger.

- **Sequenciamento Roche 454 (GS20, GS FLX, GS FLX Titanium, GS FLX +)**

A plataforma Roche 454 foi apresentada no ano 2005, implementa a abordagem sequencial por síntese. Os moldes de ADN são fixados em micropérolas e amplificados usando PCR em emulsão. Assim, as contas são distribuídas em reatores individuais de pirosequenciamento. Assim sendo, os trifosfatos de nucleotídeos, fluem através da placa numa sequência específica, incorporando cada base marcada, pela libertação do pirofosfato. As leituras produzidas por esta plataforma são significativamente mais longas do que a algumas outras tecnologias, com o último pirosequencer da Roche (GS FLX +) produz leituras até 800 pb de comprimento. As taxas de erro também são muito inferiores (0,49-1%) às observadas nas sequências de

sequenciadores da marca Illumina (HUSE et al., 2007; GILLESSE et al., 2011). Muitos desses erros parecem ser específicos do molde, contendo extensões de homopolímeros e, induzindo erros de inserção, exclusão e substituição nas leituras. Com tal característica os padrões de qualidade diminuem, independentemente de o homopolímero estar correto ou não, dificultando deste modo, o estabelecimento dos limiares de qualidade (HUSE et al., 2007; BORDONI et al., 2008). No entanto, tornou-se uma ferramenta altamente popular para sequenciamento de marcadores genéticos conservados, agora comumente conhecida como sequenciamento "pirotag" (JIMENEZ, 2012).

- **Sequenciamento Illumina (Genoma Analyzer I e II, HiSeq e MiSeq)**

A Illumina também adotou a abordagem sequencial por síntese. O protocolo de sequenciamento da Illumina começa ligando DNA modelo à sequência do adaptador e, após, a uma célula de fluxo de vidro. O molde de DNA é submetido à amplificação em ponte, pelo que cada molde é aumentado para aproximadamente 1.000 cópias (DOHM et al., 2008; AIRD et al., 2011).

Desse modo, utilizando uma polimerase isotérmica e nucleotídeos fluorescentes inativados no extremo 3', esta tecnologia é capaz de incorporar uma base única por cada ciclo. A adição de cada base é seguida por um passo de elaboração de imagem, que lê a etiqueta fluorescente; desta forma evita erros, como os causados por homopolímeros. Conquanto, possam existir distorções substanciais nas sequências ricas em G + C ou A + T, provavelmente apresentadas pelos procedimentos de amplificação do molde de DNA (KOZAREWA et al., 2009; AIRD et al., 2011). Afortunadamente, tem-se apresentado sucesso da redução do viés, na preparação de sequências. Embora, isto tenha sido principalmente destinado a projetos de comparação em paralelo com outras tecnologias. Ademais, vários estudos demonstraram a utilidade de pequenas leituras de Illumina para a montagem *de novo*, por si só ou em conjunto com outras tecnologias de sequenciamento (ZERBINO; BIRNEY, 2008; DIGUISTINI et al., 2009; REINHARDT et al., 2009).

Características como tamanho do genoma; conteúdo e porcentagem de guanina – citosina (G + C), determinarão a viabilidade de sequenciar um

genoma usando a tecnologia Illumina. Por conseguinte, metagenômas moderadamente complexos podem produzir genomas completos ou quase completos utilizando exclusivamente a plataforma Illumina (HESS, 2011; KASSAI-JÁGER et al., 2008).

- **Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)**

Embora seja uma tecnologia de sequenciamento por síntese, o Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), adota um enfoque novo para o sequenciamento de DNA. O Ion Torrent PGM supera a dependência de custosos; equipamentos; fotorreceptores e, reagentes artificiais. Pelo uso de dNTPs naturais, e a medida das mudanças sutis no pH, isto, em oposição à luz emitida, durante os eventos de polimerização (BRAGG e TYSON, 2014). O Ion Torrent PGM é o equilíbrio entre o baixo rendimento do Roche 454 e o ultra rendimento da Illumina, oferecendo o custo de operação mais acessível das três plataformas (ROTHBERG et al., 2011).

Tal como, acontece com a tecnologia de pirosequenciamento de Roche 454, o Ion Torrent - PGM insere dNTPs na câmara de reação, com zero ou mais nucleotídeos ligados em cada fluxo. Durante a reação de polimerização, um íon de hidrogênio é liberado, resultando na diminuição do pH da solução. Deste modo, a diminuição do pH é proporcional ao número de nucleotídeos que se ligam durante o fluxo. Em quanto ao índice de erro, considera-se que o Ion Torrent – PGM, apresenta uma taxa de erro entre 1 e 1,7%, associada a fluxos excedentes ou insuficientes (LOMAN et al., 2012; ROTHBERG et al., 2011). Mas, as taxas de erro podem aumentar por ciclo de fluxo e não são homogêneas em todos os fluxos, dentro do ciclo. Tal como acontece com Illumina, o Ion Torrent PGM exerce viés de cobertura em fragmentos de DNA, com conteúdo muito baixo ($\leq 20\%$) ou muito alto ($\geq 80\%$) da percentagem de G + C. Indicando falsas asseverações dos membros da comunidade dentro do metagenôma (BRAGG et al., 2013; QUAIL et al., 2012).

Sem embargo, o Ion Torrent - PGM tem sido amplamente empregado em bibliotecas de ampliacons e amostras metagenômicas (SOLONENKO et al., 2013; JÜNEMANN et al., 2013; WHITELEY et al., 2012; YERGEAU et al., 2012).

2.6.2 Estratégias para o estudo de amostras metagenômicas

No início da metagenômica, as bibliotecas metagenômicas foram construídas a partir do DNA purificado, com o objetivo de realizar análises funcionais. No entanto, hoje o sequenciamento é o método de análise mais comum, devido ao baixo custo das técnicas de sequenciamento pós-Sanger como pirosequenciamento; sequenciamento por síntese (Roche 454, Illumina) e por liberação de prótons (Ion Torrent) (PEÑA et al., 2013).

Entre as vantagens deste método, está a obtenção de terabytes de informação genética, sem envolver processos de seleção e minimizando o viés de algumas metodologias por exemplo, amplificação do rDNA 16S. No entanto, uma desvantagem de sequenciamento é a montagem bioinformática das sequências obtidas (CORTÉS-LÓPEZ et al., 2014). A montagem é baseada na sobreposição das sequências para reconstruir seções completas e contíguas de DNA (contigs) para montar genomas completos. Porém, muitas vezes, "contigs", não são suficientemente grandes para abranger uma região inteira e, portanto, não podem ser montados. Daí que, seja desejável que os fragmentos produzidos pelo sequenciamento estejam de tamanho grande, pois assim, sua montagem será mais fácil comparado, com a montagem de fragmentos menores (BONILLA; SOUZA; EGUIARTE, 2008; CORTÉS-LÓPEZ et al., 2014).

Os progressos atuais, nas tecnologias de sequenciamento de nova geração, têm a capacidade de produzir centenas de giga-bases de dados, através do sequenciamento de DNA a um custo baixo. O que permite aceder de uma maneira mais extensa e num curto período de tempo, à grande parte da diversidade de microrganismos e genes funcionais nos distintos nichos ecológicos (Figura 2) (HUNTER et al., 2014; WATSON, 2014).

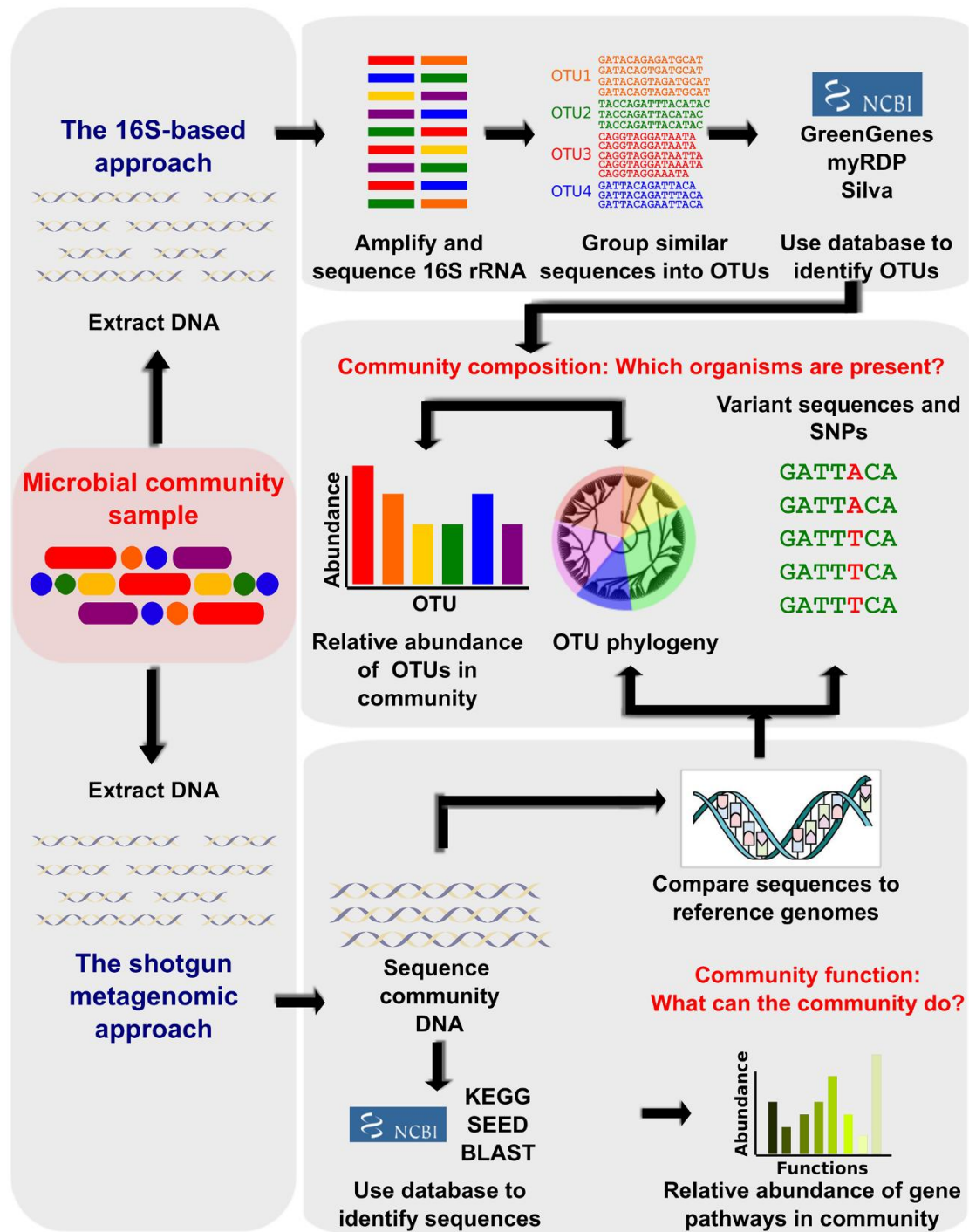


Figura 2. Metodologias Bioinformáticas no estudo da diversidade microbiana e funcional, mediante abordagens metagenômicos empregando sequenciamento de nova geração (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012).

2.6.3 Metagenômica aplicações biotecnológicas

O estudo do DNA obtido diretamente de amostras ambientais, acessa os genomas coletivos e ao potencial bioativo dos diversos gêneros bacterianos presentes. (HANDELSMAN, 2004). A metagenômica, portanto, fornece um meio de explorar novos metabolitos de bactérias que se reconhece estão presente em determinados ambientes, mas que permanecem recalcitrantes ser cultiváveis (BANIK e BRADY, 2010). Além disso, a metagenômica é particularmente atraente para a descoberta de produtos naturais, porque a informação genética que codifica atividades de interesse, esta agrupada em genomas bacterianos, possibilitando a clonagem de uma via metabólica inteira, num indivíduo (HANDELSMAN et al., 1998; BANIK e BRADY, 2010).

Portanto, as abordagens de rastreamento metagenômico de alto rendimento, baseado em sequências e função, podem ser empregadas, para replicar vias metabólicas e compostos conhecidos; reduzindo assim, o alto grau de redundância, obtido através de abordagens baseadas na cultura tradicional. Por conseguinte, abordagens de triagem metagenômica cobrem uma ampla gama de técnicas, as que estão sujeitas às especificações na produção ou descoberta do composto alvo (Figura 3).

Os diversos micro-biomas podem potencialmente fornecer uma ampla gama de novas enzimas e biocatalizadores com grandes aplicações no mercado biotecnológico, de biocombustíveis e indústrias farmacêuticas (COWAN et al., 2004). Hess e colaboradores (2011), relataram através de um estudo metagenômico, mais de 2,5 milhões de novos genes e identificaram mais de 27.000 enzimas putativas com função celulolítica. Também, revelaram os genomas quase completos de 15 microrganismos não cultiváveis, usando montagem *de novo*, a partir de amostras de rúmen de vacas fistuladas, usando plataforma de Illumina. Do modo semelhante, em amostras de digesta ruminal, utilizando sequenciamento Illumina e montagem *de novo*, Wallace e colaboradores (2015), revelaram mais de 1,5 milhão de

genes putativos, das quais o 58% não apresentaram domínio proteico conhecido.

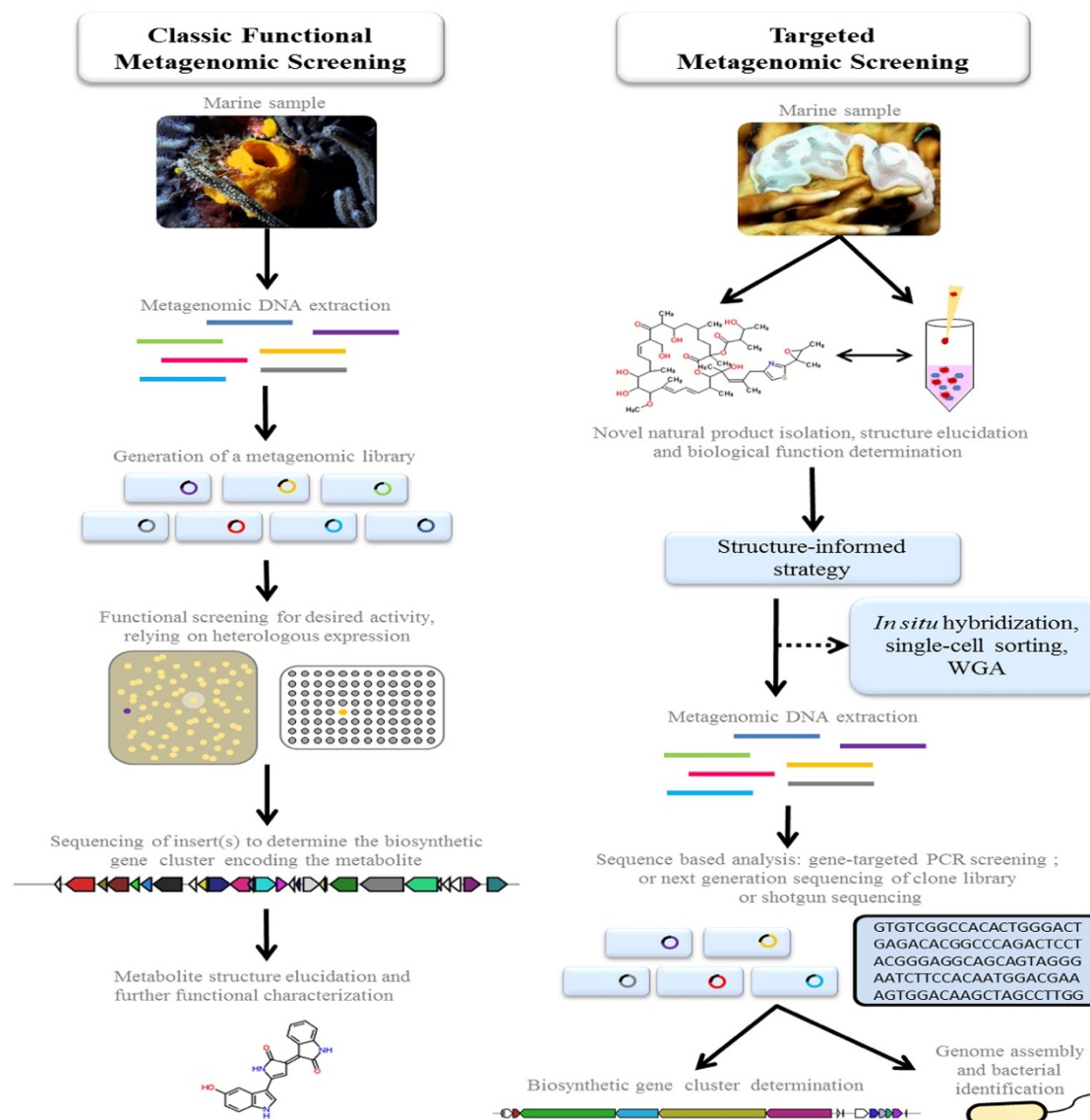


Figura 3. Comparação de abordagens metagenômicas funcionais, orientadas para a descoberta e produção de produtos naturais de interesse biotecnológico. (TRINIDADE et al., 2015).

A riqueza das informações descobertas, pelas análises metagenômicas, assim como, a diversidade microbiana; os estudos nas diversas áreas do metabolismo descaracterizadas, a complexidade dos ciclos biogeoquímicos, prometem fornecer novas enzimas e moléculas com diversas

aplicações biotecnológicas. Por conseguinte, convertendo a metagenômica numa ferramenta muito poderosa, para procurar novas enzimas de utilidade e aplicação biotecnológica.

Como a celulose, é um biopolímero valioso para a produção de biocombustíveis e outros produtos. Um número significativo de publicações tem relatado o isolamento de celulasas derivadas de metagenômas. Por exemplo, o rastreio funcional de uma biblioteca metagenômica do solo, para celulasas revelou um total de oito clones celulíticos, um dos quais foi purificado e caracterizado completamente (VOGET et al., 2006). Enquanto, a maioria das pesquisas metagenômicas para celulasas novas, concentram-se focadas em ambientes extremos, existem evidências suficientes de que, ambientes não-extremos e, portanto, geneticamente bastante diversos, também possuem uma gama de celulasas altamente estáveis e adequadas para aplicações industriais (POPKÄMPFER et al., 2009). Por outro lado, vale ressaltar que as abordagens baseadas em diversos tipos de sequenciamento metagenômicos levaram à identificação de numerosos clones de celulosas putativas (WARNECKE et al., 2007).

A celulose é, junto com a quitina, provavelmente a fonte de energia renovável mais abundante. As plantas geralmente contêm 35-50% (peso seco) de celulose. Esse polímero é constituído por subunidades de glicose β -1,4 ligadas (Figura 3) e deve ser hidrolisada em açúcar fermentável para poder ser usada como uma fonte valiosa para a produção do bioetanol e outros produtos (LLMBERGER N. e STREIT W. 2009).

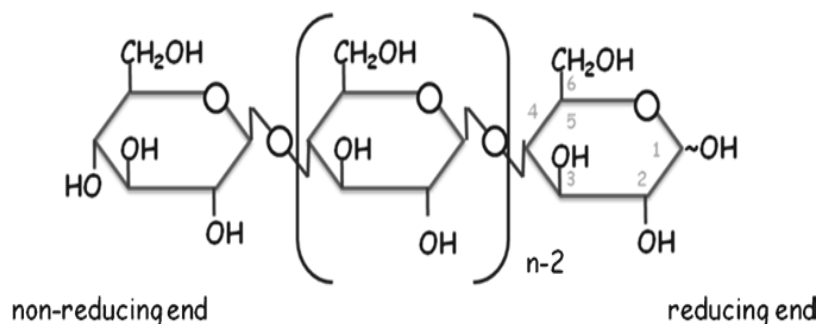


Figura 3. Estrutura de celulosa D-glicose, longo polímero ligações β -1-4. (LLMBERGER, 2010).

A degradação da celulose pode ser realizada por tratamento químico ou hidrólise enzimática. A degradação química, tem a desvantagem de poluentes e custos excessivos. E para a hidrólise enzimática em larga escala, surge um problema: a celulose é insolúvel em água, enquanto que, as celulasas necessitam de um ambiente aquático para a sua funcionalidade. Uma solução pode ser o uso de líquidos iônicos como solvente (HEINZA et al., 2005). As celulasas são distinguidas de outras hidrolases de glicosídeos, pela sua capacidade de hidrolisar as ligações β -1,4-glicosídicas entre os resíduos de glicose. A ruptura enzimática das ligações β -1,4-glicosídicas na celulose, prossegue através de um mecanismo de hidrólise ácida utilizando um doador de próton e nucleófilo ou base. A hidrólise pode resultar na inversão ou retenção (mecanismo de substituição dupla) da configuração anomérica do carbono-1 na extremidade redutora (HILDEN et al., 2004). Existem três tipos principais de atividades de celulase com base em seus mecanismos de ação catalítica: β -1, 4-endoglucanase (EC3.2.1.4); exoglucanase (incluindo celobiohidrolase (EC3.2.1.91) e cellodextrinase (EC3.2.1.74) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21). As endoglucanases cortam aleatoriamente sítios internos na superfície de celulose cristalina, gerando novas extremidades de cadeias. As celobiohidrolase, atuam na redução ou não-redução de extremidades de celulose, libertando celobiose como produtos principais. As β Glucosidases hidrolisam cêludextrinas solúveis e celobiose em glicose (LYND et al., 2002). Muitos organismos, incluindo animais, plantas e microrganismos, produzem celulasas; no entanto, a maioria das celulasas são de origem microbiana (LYND et al., 2002).

Os microrganismos aeróbicos, costumam usar o mecanismo de celulase livre (sistemas de celulase não complexa) para digerir a celulose; por exemplo, os fungos, *Trichoderma reesei*, *Humicola insolens* e *Phanerochaete chrysosporium*, e bactérias pertencentes aos gêneros *Cellulomonas*, *Thermobifida* e *Bacillus*, produzem sempre celulasas individuais, incluindo endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase (LYND et al., 2002; WILSON, 2008). A maioria dos microrganismos anaeróbicos, digerem a celulose usando seu celulosoma, que é um complexo grande de celulase, alguns exemplos são os celulosomas de diferentes Clostridia (*Clostridium thermoocellum*, *C.*

cellulolyticum, *C. cellulovorans* e *C. josui*) e espécies de *Ruminococcus* habitantes do rúmen que já foram estudados em detalhe (BAYER et al., 2004).

O fósforo (P) é um elemento mineral chave para o crescimento, a reprodução e o metabolismo dos animais. Em alimentos para animais feitos de leguminosas e cereais, uma proporção elevada (40% a 70%) do P total poderia estar presente no ácido fítico (hexo-fosfato de mio-inositol). Nas plantas, o composto principal para armazenamento de fósforo inorgânico é o fitato. Particularmente abundante em grãos de cereais. O ácido fítico é um composto estável que é difícil de ser hidrolisado quimicamente, a não ser que seja catalisado pela atividade de enzimas específicas, as inositol fosfohidrolases, alternativamente conhecidas como fitases, as que podem clivar as ligações múltiplas de éster fosfórico no ácido fítico. (MULLANEY et al., 2003; DING Q et al., 2010). As fitases e as hidrolases de polissacarídeos, são suplementos alimentares, importantes na criação de aves e suínos. Devido a que, auxiliam aos animais monogástricos a utilizarem plenamente os alimentos, obtendo assim, um maior índice de conversão alimentar, além de diminuir a poluição ambiental.

O fitato é a forma mais prevalente dos fosfatos de inositol e envolvem um grupo de compostos de fósforo orgânico amplamente encontrado na natureza. Nos ecossistemas terrestres, o fitato é sintetizado por plantas e representa uma quantidade muito relevante (60 a 80%) do fósforo orgânico no solo. Nos ambientes aquáticos o fitato a partir do escoamento terrestre é a principal fonte externa de fósforo orgânico, sendo um componente menor; sugerindo que ele é rapidamente hidrolisado em condições aquáticas. Portanto, o fitato pode ter a principal fonte de fósforo disponível, em ambientes aquáticos (LIM et al., 2007).

Porquanto, nem todas as fitases são estruturalmente semelhantes, nem tampouco clivam grupos fosfato a partir de fitato, pelo mesmo mecanismo. Daí que, variadas propriedades catalíticas e exigências relacionadas com estas enzimas, refletem os diferentes métodos, pelos quais os organismos desfosforilam o fitato, para produzir fosfatos de mio-inositol. Assim, a fitase (mio-inositol hexaquisphosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.8 ou EC 3.1.3.26), que é segregada por uma variedade de

microrganismos, tem a capacidade de quebrar rapidamente o fitato em compostos de fósforo myo-inositol, bem como em outros nutrientes que podem ser consumidos e utilizados pelos animais (LIM et al., 2007; LIM e ULLAH 2003).

Hao Tan e colaboradores (2014), implementaram uma abordagem metagenômica, baseados na função, para rastrear e identificar a atividade de fitases, numa biblioteca derivada de um solo agrícola. Obtendo a identificação de duas novas fitases. Uma dessas fitases, pertence a família fosfatase incomum, com o motivo conservado do sítio ativo e possuindo um resíduo de aminoácido adicional. A outra fitase, pertence a um novo tipo, que é codificado por várias ORFs, diferentes das fitases atualmente conhecidas, as quais são codificados por uma única ORF. Recentemente no ano 2015, um gene da fitase que codifica para uma proteína da família da fosfatase ácida de histidina (HAP), foi identificado, num metagenoma de disposição pública, derivado de águas subterrâneas. A sequência de nucleotídeos do gene da fitase, foi clonado e sintetizado quimicamente, com a finalidade de sobre-expressar a fitase em *Escherichia coli*. A proteína purificada da fitase recombinante demonstrou, atividade de ácido fítico de $298 \pm 17 \mu\text{mol P/min/mg}$, pH ótimo de 2,0 e, temperatura de 37°C . Com um ótimo pH, por embaixo da maioria das fitases HAP conhecidas. Sugerindo, que esta fitase possa possuir, uma melhor capacidade de adaptação às condições de baixos pH, produzidos pelo ácido gástrico em animais monogástricos (TAN et al., 2015).

De outro lado, os produtos naturais microbianos exibem imensa diversidade e complexidade estrutural e têm capturado a atenção dos pesquisadores por várias décadas. Eles foram explorados para um amplo espectro de aplicações, sendo o mais notável o papel proeminente na medicina, e sua versatilidade se expande, para a aplicação de medicamentos em muitas doenças. Sendo um importante recurso, para esta produção, hoje e nos últimos 30 anos, 70% dos antimicrobianos e 60% dos quimioterápicos foram desenvolvidos ou sintetizados de maneira análoga (POMPONI, 2001; GRÜSCHOW et al., 2011). Tradicionalmente, fontes terrestres forneceram a maior parte dos produtos naturais para moléculas de drogas. O acesso a ambientes inexplorados que abrigam microrganismos exclusivos é promissor

para a descoberta de novos metabólitos bioativos com funcionalidades distintas (MONTASER R e LUESCH, 2011; TRINIDADE et al., 2015).

A maioria dos produtos naturais microbianos, biologicamente ativos são produzidos por cepas que podem ser isoladas e cultivadas em laboratório. No entanto, a era genômica revelou que as bactérias cultivadas representam uma mera fração da biodiversidade bacteriana total estimada. Com o desenvolvimento da metagenômica, a maioria dos microrganismos, passaram a ser acessíveis para análises funcionais. Pelo que, através de estudos metagenômicos, novos biossintéticos, estão sendo descobertos num ritmo que anteriormente não era possível. Destacando-se o impacto dessas descobertas, no campo dos produtos naturais (MICHEAL et al., 2013; BASHIR et al., 2014).

As bactérias são provavelmente a maior esperança para a descoberta de novos antibióticos, para combater a crescente prevalência de agentes patogênicos resistentes aos antibióticos (WRIGHT, 2012). Como exemplo disso, são conhecidos mais de 10.000 metabólitos biologicamente ativos, com propriedades terapêuticas contra câncer, HIV, inflamações e muitas outras doenças humanas (BÉRDY, 2005).

Na área de fármacos de produtos naturais, metabólitos ou vias putativas para famílias estruturais conhecidas e, algumas famílias estruturais anteriormente não relatadas, têm sido isolados de solos (CHANG e BRADY, 2011; FENG et al., 2011), insetos (PIEL, 2002), animais marinhos (RATH et al., 2011; SCHMIDT et al., 2012), dentre outros habitats ecológicos usando ferramentas metagenômicas. Além disto, montagens de sequências mais longas, permitiram a detecção mais sensível de características genômicas complexas, tais como: CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats); PKS (polyketide synthase) ou NRPS (non-ribosomal peptide synthase) clusters de genes que codificam para metabólitos secundários. No ano 2002 Gillespie e colaboradores, isolaram genes para Turbomicinas A e B de uma biblioteca metagenômica, demonstrando a viabilidade e o potencial das abordagens metagenômicas para pesquisar novos compostos antimicrobianos. Similarmente, Chang e Brady relataram um agrupamento de genes isolados do solo, que codifica compostos à base

de Indolotriptenolina, uma família pequena e relativamente rara de produtos naturais que exibem uma atividade potente contra certas linhas de células tumorais (GILLESPIE et al., 2002; CHANG e BRADY, 2011).

Estes descobrimentos fomentaram amplas ações em busca de novas drogas biomédicas importantes, como evidenciado por vários estudos. A pesquisa de moléculas bioativas usando uma abordagem metagenômica geralmente, tem sido conduzida usando métodos baseados em homologia ou rastreamento funcional de genes (ALLEN et al., 2009; BANIK e BRANDY 2010).

2.7 Citricultura no Brasil

Um dos setores mais competitivos do agronegócio no Brasil é a citricultura. Sendo, o estado de São Paulo o responsável por 74 % da produção de laranjas e de 95% da produção de suco concentrado (INVESTE, 2012). O maior produtor de suco concentrado de laranja no mundo é Brasil, as exportações abrangem mais de US\$ 1,5 bilhão por ano; gerando assim empregos diretos e indiretos (CITRUSBR, 2016).

A citricultura envolve o cultivo de laranja, limão, lima e tangerinas. O gênero *Citrus* compreende as famílias das Meliáceas, Simaruláceas e Rutáceas (ALVES; MELO, 2003). As espécies de frutos mais cultiváveis são: as laranjas doces (*Citrus sinensis Osbek*); as tangerinas (*Citrus reticulata Blanco*); os limões verdadeiros (*Citrus limon, Lush*); as limas ácidas tahiti (*Citrus latifolia, Tanaka*) e galego (*Citrus aurantifolia, Tanaka*) e, o pomelo (*Citrus maxima*) assim como outras espécies menos conhecidas. (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005)

Durante a última década, os cultivares de citros, vêm sofrendo com doenças bacterianas como o “Greening” (“Huanglongbing/HLB”), a Clorose Variegada dos Citros (CVC) e o Cancro Cítrico. Doenças que foram responsáveis pela erradicação de 39 milhões de árvores do parque citrícola de São Paulo e do Triângulo Mineiro, onde a cultura é feita de maneira intensiva (NEVES et al.,2010).

Uma das mais ameaçadoras doenças dos citros é o cancro cítrico,

afetando quase todos os tipos de culturas cítricas comercialmente importantes, comprometendo significativas perdas de produção, principalmente para os cultivos de citros em larga escala (GRAHAM; GOTTWALD; PIERCE, 2004. Segundo o Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), a incidência do cancro cítrico passou de 1% no ano 2011, para 1,39 % em 2012, sendo o mais alto dos últimos 12 anos (FUNDECITRUS, 2013). Ademais, tem dificultado e restringido o comércio a nível mundial de frutas cítricas in natura, por ser uma doença quarentenária. Esta doença provoca extensos danos aos citros e a gravidade da infecção varia de acordo com as diferentes espécies bacterianas e as condições climáticas prevalentes.

Para a doença cancro cítrico não existe um controle eficiente, no Brasil, o controle baseia-se essencialmente na exclusão e erradicação de plantas e pomares afetados pela doença e, na pulverização com cobre, a que deve ser repetida para cada brotação da doença (GRAHAM et al., 2004). No entanto, esse controle químico, não é eficaz em bloquear adequadamente o desenvolvimento da doença e, seu uso pode ocasionar o surgimento de isolados resistentes (BEHLAU et al., 2012). Portanto, novos métodos de controle devem ser buscados a fim de encontrar um mecanismo efetivo para o tratamento e controle da doença.

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) é o agente etiológico da doença conhecida como cancro cítrico. A *Xcc* é uma bactéria Gram negativa que possui forma de bastonete; aeróbica; com metabolismo oxidativo e nunca fermentativo; não é fixadora de nitrogênio; não forma esporos; possui um único flagelo polar. Forma colônias amarelas e mucoides em meios de cultura artificiais, Por causa do pigmento conhecido como xanthomonadina, ademais, tem aparência brilhante por causa do exopolissacarídeo conhecido como goma de xantana (STARR 1981; JANSSON et al., 1975; BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

A invasão e a colonização do hospedeiro é realizada através de aberturas naturais das folhas (estômatos) e pelos ferimentos nos tecidos

vegetais (GABRIEL et al., 1989; RYAN et al., 2011). O patógeno se multiplica nos espaços intercelulares para causar o cancro, desencadeando hiperplasia e hipertrofia no hospedeiro ao alterar a transcrição de alguns genes. Os sintomas típicos incluem lesões corticosas e necróticas, rodeadas por uma margem embebida de água ou óleo nas folhas e frutos, seguidos da desfolha induzida, geral declínio de árvores, frutos deteriorados e queda prematura de frutos em árvores severamente infectadas. (CERNADAS; CAMILLO; BENEDETTI, 2008).

Existem três formas diferentes de cancro cítrico, causadas por duas espécies de *Xanthomonas*, cancro cítrico tipo A, B e C. A diferenciação dessas formas é baseada principalmente na distribuição geográfica e gama de hospedeiros do patógeno, (STALL e SEYMOUR, 1983). A forma asiática de cancro é a cancrose tipo A, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* (*Xcc*) (SCHAAD et al., 2005) é a forma mais comum e generalizada doença e, sua distribuição geográfica continua no aumento. A doença é endêmica em mais de trinta países: de Ásia, no pacífico da Índia, Paquistão, as ilhas do Oceano Índico, Sudeste Asiático, na América do Sul, e no Sudeste da China e Japão. *Xcc*, tem um amplo rango de hospedeiro, causando a doença na grande maioria das espécies cítricas: *C. paradisi*, *C. aurantifoli*, *C. sinensis* e *C. reticulata*. A cancrose tipo B é causada pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (*XauB*) (MOREIRA et al., 2010), tem sintomas similares a os sintomas presentes no cancro A, mas, os sintomas demoram mais tempo em aparecer; isto como consequência do crescimento mais lento de bactéria (*XauB*), o rango de hospedeiro esta restrito a *C. limon*, mas também tem sido isolado esporadicamente de *C. sinensis* e *C. paradisi* (NAMEKATA, 1971; CIVEROLO, 1984). Esta cancrose tipo B, foi inicialmente isolada na Argentina, mas ate hoje tem sido reportado casos de doença também em Uruguay e Paraguay (CIVERLO, 1984). A cancrose tipo C só tem sido identificado no estado de São Paulo, Brasil (MALAVOLTA et al., 1984) e tem os mesmos sintomas que o cancro cítrico tipo A, é causada por *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (*XauC*) e só infecta a *C. aurantifolii* (MOREIRA et al., 2010).

Referências bibliográficas

ANTUNES, L.; MARTINS, L. F.; PEREIRA, R. V.; THOMAS; ANDREW M. T.; BARBOSA, D.; LEMOS, L. N.; MACHADO SILVA, G. M. M; MOURA L. M. S. EPAMINO, C. G. W.; DIGIAMPIETRI L. A; LOMBARDI L. A.; LOMBARDI K. C.; LOCOSQUE, R. P.; QUAGGIO R. B.; DE OLIVEIRA, F. J. C.; PASCON, C.R.; DA CRUZ J. B.; DA SILVA A. M.; SETUBAL J.C., Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics **Nature Scientific Reports**, 2016

ALLEN H.K.; MOE, L. A.; RODBUMRER, J.; GAARDER, e HANDELSMAN J., Functional metagenomics reveals diverse β - lactamases in a remote Alaskan soil, **ISME Journal**, vol. 3, no. 2, pp. 243–251, 2009

ALVAREZ T.M, PAIVA, J. H.; RUIZ, D.M.; CAIRO J. P. L. F.; PEREIRA, I.O.; PAIXÃO D. A.; DE ALMEIDA R. F.; TONOLI, C. C.; RULLER, R. C.; SANTOS, C.; SQUINA, F. M.; MURAKAMI, M. T. Structure and function of a novel cellulase 5 from sugarcane soil metagenome, **PLoS ONE**, vol. 8, no. 12, Article ID e83635, 2013

ARNALDO G.; MARTINI, V.P.; FAORO H.; COUTO G. H.; MÜLLER-SANTOS M.; MONTEIRO R. A.; MITCHELL D. A.; DE SOUZA, E. M.; M FABIO O PEDROSA, F. O.; NADIA KRIEGE, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach, **Microbial Cell Factories**, vol. 10, article 54, 2011

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot.** (Tokyo) 58, 1–26, 2005

BANIK, J.J. e BRADY S.F., Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules, **Current Opinion in Microbiology**, vol. 13, no. 5, pp. 603–609, 2010

BRADY, S.F.; CHAO, C.J.; CLARDY, J. New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. **J Am Chem Soc** 124, 9968-9969, 2002

CHANG, F.; BRADY S. F.; Discovery of indolotryptoline antiproliferative agents by homology-guided metagenomic screening, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 110, no. 7, pp. 2478–2483, 2013

CHENG, F.; SHENG J.; DONG, R. Y.; MEN, L.; SHEN, L. Novel xylanase from a holstein cattle rumen metagenomic library and its application in

xylooligosaccharide and ferulic acid production from wheat straw, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, no. 51, pp. 12516–12524, 2012

CHANG, F.Y.; BRADY, S.F. Cloning and characterization of an environmental DNA-derived gene cluster that encodes the biosynthesis of the anti-tumor substance BE-54017. **J. Am. Chem. Soc.** 133, 9996–9999, 2011

CHANG, L.; DING, M.; BAO, L.; CHEN, Y.; J. ZHOU, J.; LU, H. Characterization of a bifunctional xylanase/endoglucanase from yak rumen microorganisms, **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 90, no. 6, pp. 1933–1942, 2011

CHOW, J. et. al. The metagenome- derived enzymes LipS and LipT increase the diversity of known lipases, **PLoS ONE**, vol. 7, no. 10, Article ID e47665, 2012

CIVEROLO, E.L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, 37:127-145,1984

DAS, A.K. Pathogenic variability in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, causal agent of citrus canker. **J. Mycol.Pi. Pathol**, 2002

DELMONT, T. O. et. al. Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity **Applied and Environmental Microbiology** February vol. 77 no. 4 1315-1324, 2011

DOUGHERTY, M. S. Cell-Based Screening in Antibacterial Discovery. In: Dougherty T., Pucci M. (eds) **Antibiotic Discovery and Development**. Springer, Boston, MA. DOIhttps://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_28. Publisher NameSpringer, Boston, MA. Print ISBN978-1-4614-1399-8. Online ISBN978-1-4614-1400-1. 2012

DOUGHERTY, M. J. et. al. Glycoside Hydrolases from a targeted Compost Metagenome, activity screening and functional characterization. **BMC Biotechnology** 12:38, doi:10.1186/1472-6750-12-38, 2012

DUAN, C.J.; XIAN L.; ZHAO, G. C.; Feng, Y.; PANG, H.; BAI X. L.; TANG, J. L.; MA, Q. S.; J.-X. FENG. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens, **Journal of Applied Microbiology**, vol. 107, no. 1, pp. 245–256, 2009

EPSTEIN, E. The science of composting. Boca Raton, FL: **CRC Press**, 1997

FAWCETT, H.S.; A.E. JENKINS. Records of citrus Canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology**, 23: 820-824, 1933

FENG, Z.; KALLIFIDAS, D.; BRADY, S.F. Functional analysis of environmental DNA-derived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108, 12629–12634, 2011

FU, J. et. al. Characterization of a new oxidant-stable serine protease isolated by functional metagenomics, **SpringerPlus**, vol. 2, article 410, 2013

GARG, G.; SINGH, A.; KAUR, A.; SINGH, R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. 3 **Biotech**, 6(1), 47, 2016 <http://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>

GILBERT, J.A.; DUPONT, C. L. Microbial metagenomics: beyond the genome, **Annual Review of Marine Science**, vol. 3, pp. 347–371, 2011

GILLESPIE, D. E.; BRADY S. F.; BETTERMANN A. D.; CIANCOTTO N. P., LILES M. R.; RONDON M. R. et al. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 68, 4301–4306. 10.1128/AEM.68.9.4301-4306. 2002

GLAZER, A.N.; NIKAIDO, H. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology, **Ed. Cambridge University Press**, 1995

GONZÁLEZ-BACERIO, J.; RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, J.; DEL MONTE MARTÍNEZ, A. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. **Revista Colombiana de Biotecnología**, [S.I.], v. 12, n. 1, p. 124-140, 2010. ISSN 1909-8758

GONG, X.; GRUNINIGER, R. J.; FORSTER, R. J.; TEATHER, R.M.; MCALLISTER, T.A. Biochemical analysis of a highly specific, pH stable xylanase gene identified from a bovine rumen-derived metagenomic library, **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 97, no. 6, pp. 2423–2431, 2013

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, **Chemistry and Biology**, vol. 5, no. 10, pp. R245–R249, 1998

HAO, T. et. al. Identification of Novel Phytase Genes from an Agricultural Soil-Derived Metagenome. **Journal Microbiol. Biotechnol**, 24(1) 113–118, 2014. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1307.07007>

HAO T. et. al. Cloning, Overexpression, and Characterization of a Metagenome- Derived Phytase with Optimal Activity at Low pH. **J. Microbiol. Biotechnol.** 25(6), 930–935, 2015 <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1411.11012>

HÅRDEMAN, F.; LING, S.S. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment, **FEMS Microbiology Ecology**, vol. 59, no. 2, pp. 524–534, 2007

HESS, M. et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen, **Science**, vol. 331, no. 6016, pp. 463–467, 2011

HESS, M. et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen, **Science**, vol. 331, no. 6016, pp. 463–467, 2011

HUNTER, S. et al. EBI metagenomics - A new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 600–606, 2014.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology, **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 13, no. 4, pp. 390–397, 2002

JEONG, Y. S. et al. Characterization of Xyn10J, a novel family 10 xylanase from a compost metagenomic library, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 166, no. 5, pp. 1328–1339, 2012

LANDFALD, B. Functional and structural studies of a novel cold-adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library, **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 97, no. 9, pp. 3965–3978, 2013

LEE, H.A. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker. **J. Agr. Res.**, 15: 661- 665. 1918

LEE, M.; LEE, C.; OH, T.; SONG, T.J. K.; YOON, J. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases, **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 72, no. 11, pp. 7406–7409, 2006

LIM, B. L., YEUNG, P.; CHENG, C.; HILL, J.E. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. **ISME J.** 1:321–330, 2007

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. **Journal Biol Chem.** 283(45): 30433–30437, 2008 doi: 10.1074/jbc.R800035200

MALAVOLTA, J.V.A. et al. Distribuição do tipo C de *Xanthomonas campestris* pv. citri no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 10:11, 1984

MCHARDY, A.C.; RIGOUTSOS, I. What's in the mix: phylogenetic

classification of metagenome sequence samples. **Curr Opin Microbiol** 10, 499–503, 2007

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12 : **Human Microbiome Analysis**. v. 8, n. 12, 2012.

MOREIRA, L. M. et al. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *Aurantifolii*, **BMC Genomics**, 11: 238, doi: 10.1186/1471-2164-11-238, 2010

M. L. T. M. POLIZELI , A. C. S. RIZZATTI, R. MONTI, H. F. TERENCE, J. A. JORGE. Xylanases from fungi: properties and industrial applications, **Applied Microbiology and Biotechnology**. Volume 67, Issue 5, pp 577-591, 2005

MULLANEY, E. J.; ULLAH, A. H.J. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** V 312, Issue 1, 5 Pages 179–184, doi: org/10.1016/j.bbrc.2003.09.176, 2003

NAGARAJAN, S. New tools for exploring old friends-microbial lipases, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 168, no. 5, pp. 1163–1196, 2012

NANNIPIERI, P. et. al. Microbial diversity and soil functions **European Journal of soil science** Volume 68, Issue 1, 2017

NAMEKATA T. Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., n.f.sp. *aurantifolia*, agente causal da cancrose do limoeiro Galego. **Piracicaba: University of São Paulo**, 1971

NEVEU, T. J.; REGEARD, C.; DUBOW, M.S. Isolation and characterization of two serine proteases from metagenomic libraries of the Gobi and Death Valley deserts, **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 91, no. 3, pp. 635–644, 2011

NIEHAUS, F.; GABOR, E.; WIELAND, S.; P. SIEGERT, P.; MAURER, K. H.; J. ECK, Enzymes for the laundry industries: tapping the vast metagenomic pool of alkaline proteases, **Microbial Biotechnology**, vol. 4, no. 6, pp. 767–776, 2011

ORHAN E.; OMA D.; GÜVENILIR, Y. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*, **Applied Biochemistry and Biotechnology A Enzyme Engineering and Biotechnology**, vol. 121, no. 1–3, pp. 183– 194, 2005

PENG, Q. et. al. Isolation of a novel alkaline- stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfatflavor production, **Microbial Cell Factories**, vol. 13, no. 1, 2014

PIEL, J. A. Polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99, 14002–14007, 2002

POTTKÄMPER, J.; BARTHEN, P.; ILMBERGER, N.; SCHWANEBERG, U.; SCHENK, A.; SCHULTE, M.; IGNATIEV, N.; STREIT, W.R. “Applying metagenomics for the identification of bacterial cellulases that are stable in ionic liquids”. **Green Chem** 11: S. 957-965. 2009

PUSHPAM, P.; RAJESH, T.; GUNASEKARAN, P. Identification and characterization of alkaline serine protease from goat skin surface metagenome, **AMB Express**, vol. 1, article 3, 2011

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. Vol. 50:403-424, 2012

RATH, C. M. et. al. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. **ACS Chem. Biol.** 6, 1244–1256, 2011

RUIZ, C.; FALCOCCHIO, S.; PASTOR, F. I.; SASO, L.; DÍAZ, P. *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated. **Appl Environ Microbiol** 73 (8): 2423-31, 2007

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.** 28:494–518, 2005

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN. J. Biotechnological prospects from

metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology. Elsevier**, Vol14 Issue 3, p303-310, doi: 10.1016/S0958-1669(03)00067-3, 2003

SCHMIDT, E. W.; DONIA, M. S.; MCINTOSH, J. A.; FRICKE, W.F.; RAVEL, J. Origin and variation of tunicate secondary metabolites. **J. Nat. Prod.** 75, 295–304, 2012

SELVIN, J. et. al. Isolation identification and biochemical characterization of a novel halotolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*, **Microbial Cell Factories**, vol. 11, article 72, 2012

SINGH, R.; DHAWAN, S.; SINGH, K.; KAUR, J. Cloning, expression and characterization of a metagenome derived thermoactive/thermostable pectinase, **Molecular Biology Reports**, vol. 39, no. 8, pp. 8353–8361, 2012

STALL, R.E.; SEYMOUR, C.P.; Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease** 67, 581–5, 1983

TORSVIK, V.L.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. **Journal of Industrial Microbiology**, 17, 170–178, 1996

VERMA, D.; KAWARABAYASI, Y.; MIYAZAKI, K.; SATYANARAYANA, T. Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (*Mxyl*) retrieved from compost-soil metagenome, **PLoS ONE**, vol. 8, no. 1, Article ID e52459, 2013

VIEITES, J.M.; GUAZZARONI, M.E.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N.; FERRER, M. Molecular Methods to Study Complex Microbial Communities. Chapter 1 **Metagenomics Methods and Protocols**. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2010

VOGET, S.; STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase, **Journal of Biotechnology**, vol. 126, no. 1, pp. 26–36, 2006

VOLLMERS J.; WIEGAND, S.; KASTE, A. Comparing and Evaluating Metagenome Assembly Tools from a Microbiologist's Perspective - Not Only Size Matters! **PLOS ONE**, 2017

WANG, H.; LI, X.; MA, Y.; SONG, J. Characterization and high-level expression of a metagenome-derived alkaline pectate lyase in recombinant *Escherichia coli*, **Process Biochemistry**, vol. 49, pp. 69–76, 2013

WILSON, D.B. Cellulases and biofuels, **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 20, no. 3, pp. 295–299. Elsevier, 2009

WILSON, M. C.; PIEL, J. Metagenomic Approaches for Exploiting Uncultivated Bacteria as a Resource for Novel Biosynthetic Enzymology, **Chemistry & Biology Perspective. Cell press** Volume 20, Issue 5, 23, Pages 636-647, 2013

WRIGHT, G.D. Antibiotics: a new hope. *Chem. Biol.* 19, 3–10, 2012

YASIR, B.; PRADEEP, S. S.; BOLIN K. K. Metagenomics: An Application Based Perspective Hindawi Publishing Corporation **Chinese Journal of Biology**, Article ID 146030, 7 pages, 2014
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/146030>

CAPÍTULO 2 – Prospecção metagenômica para detecção genes de interesse biotecnológico em amostras solo sob efeito de composto orgânico.

Resumo - O DNA proveniente de amostras ambientais é uma fonte rica de novas moléculas bioativas. A escolha do habitat a ser amostrado predefine as propriedades das biomoléculas a serem descobertas, devido à adaptação fisiológica da comunidade microbiana e as condições ambientais prevalentes. O compostagem é o processo de conversão biológica de material orgânico em um produto final estabilizado, que pode ser usado como um aditivo para a adubação do solo. Durante dito processo, mudam enormemente parâmetros como a temperatura, a composição orgânica e, o pH. Assim, as comunidades bacterianas geram um nicho ecológico, estabelecido pelas populações dominantes. A mudança nas condições ambientais seleciona drasticamente as populações bacterianas, fazendo prevalecer os seus produtos metabólicos. Gêneros bacterianos termofílicos presentes no composto como: *Cellulomonas*, *Thermobifida* e *Bacillus*, são eficientes produtores de celulases e fitases. Sendo que a celulose é um biopolímero valioso para a produção de biocombustíveis (etanol), e as fitases são suplementos alimentares importantes na criação de aves e suínos, esses gêneros bacterianos possuem um alto potencial biotecnológico. Assim mesmo, bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* isoladas frequentemente de amostras de composto e solos adicionado com o mesmo, são amplamente reconhecidas pela sua ampla produção de metabolitos secundários, entre os que destaca-se Fenazinas, Diceto-piperazines e bacillomycina. Neste estudo usando uma abordagem metagenômica, auxiliado pelo sequenciamento a larga escala, foram identificadas bactérias pertencentes a os gêneros *Thermobifida* e *Pseudomonas* produtoras de celulases e fenazinas, procedentes de amostras de solo acondicionadas com adubo orgânico, produzido na fazenda Fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Desta forma, a mineração da diversidade genética do meio ambiente particular é uma estratégia "robusta" e estabelecida para aumentar o repertório enzimático e de compostos necessário para aplicações biotecnológicas.

Palavras chave: Metagenômica, fitases, celulases, moléculas bioativas.

CHAPTER 2 – Metagenomic prospecting for the detection of genes of biotechnological interest in soil samples under the effect of organic compound.

Abstract - DNA from environmental samples is a rich source of new bioactive molecules. The choice of the habitat to be sampled predefines the properties of the biomolecules to be discovered, which is consequence to physiological adaptation of microbial community to the dominant environmental conditions. Composting is the biological conversion of organic material into a final stabilized product, which can be used as additive for soil fertilization. During the composting process the bacterial communities generate an ecological niche, it is established by the dominant populations, which changing prominently parameters such as temperature, organic composition and pH. Changes in environmental conditions drastically select the bacterial populations, making their metabolic products predominate. Thermophile bacterial genera present in compost as: *Cellulomonas*, *Thermobifida* and *Bacillus*, are efficient producers of cellulases and phytase. Since, cellulose is a valuable biopolymer for the production of biofuels, and phytase are important food supplements for breeding poultry and pigs. These bacterial genera have extraordinary biotechnological potential. Moreover, bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* frequently isolated from samples of compound and soils amended with it, which are widely recognized for their able production of several secondary metabolites, as Phenazines, Diceto-piperazines and bacillomycin. In this study using metagenomic approach assisted by large scale sequencing, cellulases and phenazines, producer bacteria, which belong to the genera *Thermobifida* and *Pseudomonas*, were identified in soil samples amended with organic compost, it which was produced at Fazenda da Fundação Zoológico de São Paulo. Mining the genetic diversity of the particular environment is a robust strategy to increase the enzymatic repertoire desirable for biotechnological applications.

Keywords: Metagenomics, phytases, cellulases, bioactive molecules

Introdução

O DNA derivado de amostras ambientais é uma fonte rica de genes para novas moléculas bioativas. A escolha do habitat a ser amostrado predefine as propriedades das biomoléculas a serem descobertas. Isto, devido à adaptação fisiológica da comunidade microbiana e as condições ambientais prevalentes. A metagenômica é uma tecnologia de relativamente recente, adicionada à caixa de ferramentas moleculares para os ecologistas microbianos e, constitui o meio mais direto e imparcial para estudar o potencial funcional das comunidades microbianas de um ambiente particular (TRINGE et al., 2005; BASHIR et al., 2014). Em abordagens metagenômicas baseadas no sequenciamento, os genes são detectados usando sondas de DNA ou oligonucleotídeos degenerados. Ditos oligonucleotídeos, têm sido derivados de sequências gênicas conhecidas que codificam a família de proteínas de interesse ou, por busca de homologia de conjuntos de dados obtidos a partir de sequenciamento de DNA (FERRER et al., 2005; KNIGHT R et al., 2012). Uma vez que, as condições ambientais dão forma à diversidade microbiana, a escolha do habitat, é essencial para uma mineração bem-sucedida de novos biocatalisadores, como tem sido demonstrado para habitats frios, quentes e halofílicos (TCHIGVINTSEV et al., 2015).

A compostagem é a conversão biológica de material orgânico em um produto final estabilizado que pode ser usado como um aditivo para a adubação do solo. O processo de compostagem, envolve principalmente a decomposição aeróbia termófila, de resíduos orgânicos sólidos. Esta metodologia compreende mudanças dinâmicas na temperatura, concentração de oxigênio, teor de umidade e disponibilidade de nutrientes (CARICASOLE et al., 2011). O componente ativo que realiza o processo de compostagem é a comunidade microbiana residente. Devido à complexidade dos materiais presentes em uma pilha de compostagem, não é razoável esperar que um único organismo seja capaz de fornecer todos os diferentes tipos de enzimas necessárias para uma biodegradação eficiente. Em vez disso, a biodegradação é tipicamente provocada por comunidades de organismos. Por

exemplo, as enzimas ligninolíticas podem promover o acesso a polissacarídeos dentro de uma mistura de lignocelulose, permitindo que outros microrganismos floresçam e cuidem de outros aspectos da biodegradação desse material (FENG et al., 2011). A grande complexidade da comunidade bacteriana presente no processo de compostagem e a sua plasticidade metabólica, tornou o composto e os solos adubados com o mesmo uma fonte altamente conveniente para o isolamento e identificação de biota produtora de enzimas para diversas aplicações biotecnológicas (HARUN et al., 2013).

Sendo que, a celulose é o principal polímero em biomassa. Além de ser, um biopolímero valioso para a produção de biocombustíveis (etanol) e outros produtos, atualmente, existe um grande esforço internacional para desenvolver alternativas renováveis aos combustíveis fósseis. Dado isso, um número significativo de publicações, têm sido relatados sobre o isolamento de celulases derivadas de metagenômas. Com no intuito de elucidar novas celulases, em diversos ambientes naturais, como solos de compostagem, amostras no rúmen, entre outros. Análises realizadas, através da construção de bibliotecas metagenômicas, seguido por rastreio dos clones biologicamente ativos. Esses biocatalisadores, têm ganhado uma importância notável, devido ao seu potencial na conversão de biomassa em combustíveis renováveis (FERNÁNDEZ-ARROJO et al., 2010; HESS et al., 2011; KO et al., 2013; FERRER et al., 2016). Consequentemente, no ano 2006 Voget e colaboradores caracterizaram uma celulase emanada de um metagenôma halo-tolerante, altamente estável. Enquanto que Duan e colaboradores (2009) determinaram o gene codificador de celulases ácidas, a partir do metagenôma de rúmen de búfalo. Similarmente, foi realizada no ano 2011 por Hess e colaboradores, a identificação de 27,755 genes putativos para a degradação de biomassa e conseguiram expressar 90 proteínas candidatas, das quais 57% apresentaram atividade enzimática ativa, contra substratos celulósicos. Revelando a importância e o potencial de celulases descobertas por estudos metagenômicos.

Existem três tipos principais de atividades de celulase com base em seus modos de ação catalítica: β -1, 4-endoglucanase (EC3.2.1.4),

exoglucanase onde se inclui a celobiohidrolase (EC3.2.1.91) e celodextrinase (EC3.2.1.74), e β -glucosidase (EC 3.2.1.21) (LYND et al., 2002). As bactérias aeróbicas e pertencentes aos gêneros *Cellulomonas*, *Thermobifida* e *Bacillus*, produtores de celulasas individuais, incluindo endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase têm sido isoladas frequentemente de amostras de composto assim como de solos onde o composto tem sido regularmente aplicado. (ACHARYA et al., 2012; RAWAT; JOHRI, 2013; YEH et al., 2013).

Outras das enzimas de alto interesse biotecnológico, frequentemente produzidas pelos microrganismos residentes no composto são as fitases, enzimas que hidrolisam ligações fosfo-monoester de ácido fítico (TOUMELA et al., 2000; MULLANEY e ULLAH 2003). As fitases, são importantes em suplementos alimentares, usados na criação de aves e suínos. Devido a que, auxiliam aos animais monogástricos a utilizarem inteiramente os alimentos, alcançando assim, um maior índice de conversão alimentar, além de diminuir a poluição ambiental (THACKER; ROSSNAGEL e RABOY, 2004; SELLE e RAVINDRAN, 2008; SELLE; COWIESON e RAVINDRAN 2009). As fitases, também podem ser usadas em agricultura sustentável para converter o fitato de solo em fosfato, que pode ser absorvido pelas culturas como fertilizante natural de fósforo (PATEL et al., 2010).

Esta enzima hidrolítica, pode ser produzida por uma grande variedade de microrganismos, dentre os quais, os micromicetes são os produtores mais ativos de fitases extracelulares microbianas. (KONIETZNY e GREINER, 2004; MUKHAMETZYANOVA; AKHMETOVA e SHARIPOVA, 2013). Sem dúvida, nem todas as fitases são estruturalmente semelhantes, nem tampouco clivam grupos fosfato a partir de fitato, pelo mesmo mecanismo, variadas propriedades catalíticas e exigências particulares nestas enzimas, refletem métodos diferentes, pelos quais os organismos desfosforilam o fitato para produzir fosfatos de mio-inositol. Assim, a fitase (mio-inositol hexaquisphosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.8 ou EC 3.1.3.26), que é segregada por uma variedade de microrganismos, tem a capacidade de quebrar rapidamente o fitato em compostos de fósforo, mio-inositol e outros nutrientes que podem ser consumidos e utilizados pelos animais (LIM et al., 2007; LIM e ULLAH ,2003).

Muitas das fitases identificadas, foram obtidas com base na similaridade de sequência (DVORÁKOVÁ et al., 1998;) e, com a utilização de primers degenerados por amplificação de PCR (YAO et al., 2008; HUANG et al., 2009; HUANG et al., 2013). No entanto, tais abordagens poderiam ter redução na competitividade e, na identificação de novas fitases com ausência ou baixa homologia frente a outras fitases conhecidas (HAO et al., 2014). Consequentemente, a procura e identificação de fitases hoje em dia tem alta demanda para diversas aplicações industriais (JORQUERA et al., 2008; HUANG et al., 2009; YAO et al., 2012).

Sabe-se, há muito tempo que certos microrganismos do solo que produzem antibióticos, inibem agentes patogênicos nas plantas, feito evidenciado tanto no laboratório, quanto no campo (STALLINGS, 1954). A exploração dessas interações antagônicas naturais, foi a força motriz na pesquisa, sobre o controle biológico de patógenos das plantas ao longo do século passado. Entretanto, apenas nas últimas décadas o controle de patógenos, por antibióticos produzidos em níveis biologicamente relevantes, no meio ambiente foram demonstrados conclusivamente. Entre os avanços conceituais, que sustentam o progresso na compreensão do rol dos antibióticos no ambiente, tem sido reconhecido que: cepas individuais muitas vezes são capazes de produzir mais de um composto inibitório (CHANDER et al., 2005).

A detecção de antibióticos por métodos diretos, requer conhecimento de suas propriedades biofísicas e pode ser laboriosa e dispendiosa. Diante disso, muitas vezes é mais conveniente monitorar o potencial, ou a consequência da produção de antibióticos no meio ambiente. Em alternativa, a detecção de genes de biossíntese de antibióticos, expressos ou não, auxiliada por abordagens metagenômicas, fornece informações sobre: a distribuição de produtores de antibióticos na natureza e, serve como uma primeira indicação de que antibióticos, poderiam estar presentes em fenômenos biológicos, em níveis biologicamente relevantes, como a supressão de patógenos em plantas (CRAIG et al., 2010; FERNÁNDEZ-ARROJO et al., 2010; IMHOFF; LABES e WIESE, 2011; CHENG et al., 2017).

Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* têm sido isoladas frequentemente de amostras de composto e solo adicionado com composto (ACHARYA et al., 2012). Muitas espécies pertencentes a estes gêneros bacterianos são amplamente reconhecidas, pela ampla produção de metabolitos secundários, entre os que se destacam Fenazinas, Dicetopiperazines e Bacilomicina, (KILANI- FEKI et al., 2010; PAL et al., 2004).

Considerando-se esses vários aspectos, da importância biotecnológica de produtos microbianos, os principais objetivos neste estudo foram a mineração de sequencias de genes de interesse biotecnológico, principalmente focados nas enzimas fitases e celulases, assim como em compostos antimicrobianos. Essa prospecção gênica, foi realizada usando-se uma abordagem metagenômica a partir de DNA extraído de amostras de solo da horta pertencente à Fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP).

Material e métodos

Amostragem

A coleta das amostras foi realizada em triplicata, no solo da horta pertencente à Fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) (Figura 1), com localização em Araçoiaba da Serra - SP conforme as coordenadas na tabela 1. Por cada ponto de amostragem foram feitas coletas em duas épocas do ano. Para as amostras coletadas no mês de abril, os metagenômas foram identificados como H1A, H2A, H3A, enquanto que, a coleta feita em setembro foi identificada com H1S, H2S, H3S.

Tabela 1: Coordenadas dos pontos de coleta das amostras de solo da horta

	P1	P2	P3
Longitude	47°35'12.02"O	47°35'12.41"O	47°35'13.01"O
Latitude	23°34'47.17"S	23°34'46.59"S	23°34'46.53"S

A horta tem sido submetida à prática de adubação com composto orgânico numa proporção de 200 t ha⁻¹, além de fertilizantes minerais CÉLICO (2015). O composto é produzido no Parque Zoológico de São Paulo realizado a partir de galhos de árvores triturados e folhas da floresta tropical atlântica, material de cama dos animais, além do chorume e resíduos de alimentos de cerca de 400 espécies de animais albergadas no jardim zoológico (MARTINS et al., 2013; ANTUNES et al., 2016).



Figura 1. Mapa de Araçoiaba da Serra – SP delimitando área de amostragem e localização de pontos na horta da Fazenda da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Google Earth

No presente estudo utilizou-se três pontos de amostragem, onde foram coletadas 4 amostras por ponto. Posteriormente foram misturadas, as sub-amostras de cada ponto. Todas as amostras, estiveram realizadas numa profundidade entre 0-20 cm com ajuda de um trado. Após da remoção de raízes e resíduos vegetais, as amostras foram imediatamente armazenadas a -80 °C até a extração do DNA metagenômico.

Extração do DNA metagenômico e sequenciamento

A extração do DNA metagenômico foi realizada em 250 mg de amostra de solo, utilizando o kit de isolamento PowerLyzer® Powersoil® (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada por espectrofotometria no NanoDrop e por eletroforese em gel de agarose e a concentração final de DNA foi medida pelo fluorômetro Qubit 3.0 usando Qubit® dsDNA BR Assay Kit. Subsequentemente o DNA foi sequenciado no laboratório de Bioquímica de

Microrganismos e Plantas da FCAV/UNESP, empregando o método de *paired-end* no equipamento de última geração HiscanSQ Illumina. Bibliotecas de 100nt de DNA metagenômico foram construídas usando os kits de preparação de amostra de DNA Illumina® TruSeq® seguindo as instruções do fabricante.

Processamento e análises das sequências obtidas

As leituras geradas pela plataforma Illumina® no formato FastQ, foram submetidas a uma análise de qualidade utilizando o programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), posteriormente pré-processadas usando os programas: Scythe (BUFFALO, [s.d.]); Cutadapt (MARTIN, 2011) e PrinSeq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011).

Estes arquivos de saída do sequenciamento foram carregados para o servidor MG-RAST (Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology) para a execução sua análise. Para a remoção de artefatos de sequenciamento (duplicatas técnicas), o MG-RAST emprega uma aproximação de *k-mer* para identificar 20 caracteres idênticos prefixados nas sequências (MEYER F. et al., 2008). O servidor MG RAST fornece uma análise que permite estimar em cada metagenôma a quantidade de categorias funcionais atribuídas. O MG-RAST tem valores padrão definidos para os vários parâmetros de seleção dos dados, que por sua vez podem ser modificados pelo usuário. O valor de corte usado foi (*E-value*) foi $1e^{-5}$, com um alinhamento de mínimo de 80 aminoácidos e 80% de identidade. Estas sequências, foram posteriormente atribuídas por similaridade aos clusters ortólogos (COG).

O diagrama de fluxo (Diagrama 1), mostra uma breve descrição das etapas envolvidas no processo das análises das sequencias estudadas, usando MG-RAST. O servidor do portal MG-RAST, desenvolve etapas, como a normalização, onde principalmente, se ajustam e dispõem os dados, para reduzir a redundância, aumentar a integridade e, o desempenho nas analises. Gerando uma identificação interna única de cada leitura. Na etapa posterior, procura-se por potenciais genes codificadores de proteínas. Essa

identificação de genes é realizada através do uso do algoritmo BLAT contra o banco de dados MG-RAST não redundante chamado M5nr. Dito banco de dados não redundante, está constituído por outros bancos de dados que realizam contínuas atualizações como: GO (Gene Ontology), Greengenes (16S rRNA Gene Banco de Dados), JGI (Joint Genome Institute), KEGG (Enciclopédia Kyoto de Gene e genomas), NCBI (National Center for Biotechnology Information), RDP (Database Project Ribossômico), SEED (Subsistemas de sementes Anotação), SILVA (Database Project SILVA rRNA), UniProt (UniProt Base de Conhecimento), VBI (Virginia Bioinformatics Institute) e eggNOG (grupos ortográficos não supervisionados) (MEYER, F. Et al., 2009; OVERBEEK, R. et al., 2013).

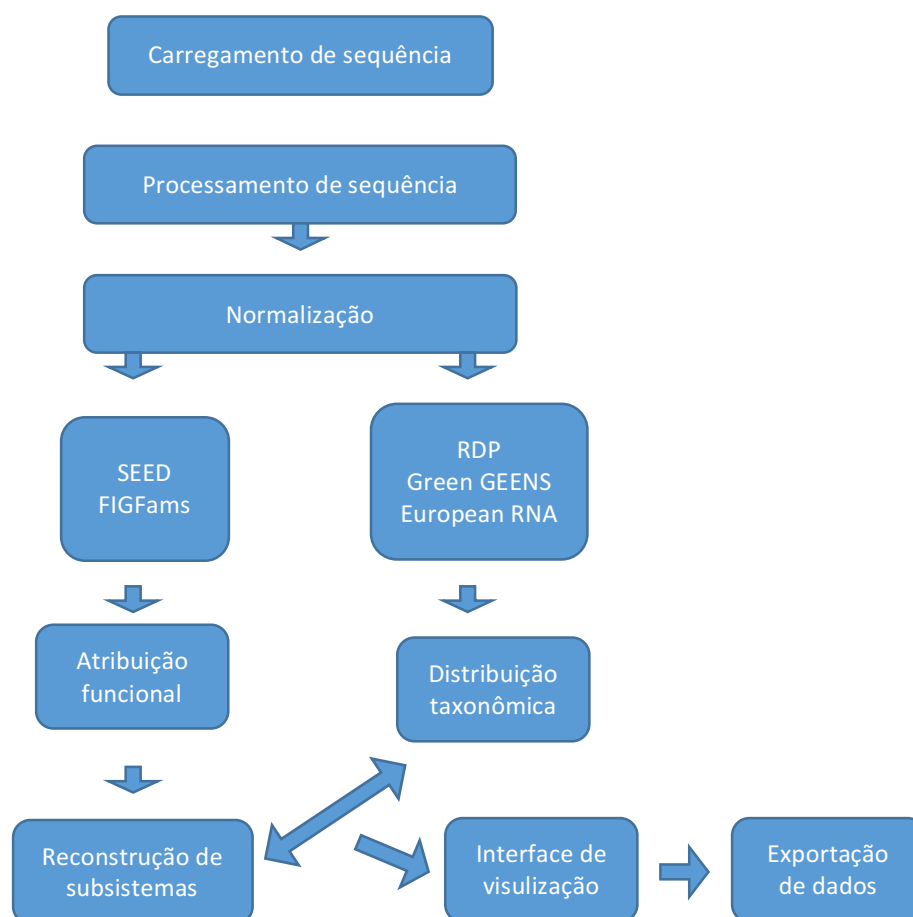


Diagrama 1. Etapas envolvidas no processamento de dados metagenômicos conforme o manual para as análises de dados na plataforma MG-RAST.

A anotação usada pelo portal MG-RAST é feita em um ambiente chamado SEED (<http://www.theseed.org>) que organiza os dados genômicos sob a forma de subsistemas e não com base em organismo por organismo. O conceito de subsistema consiste em uma integração bidimensional de funções biológicas com sequências genômicas. As categorias funcionais são, em primeira instância, atribuídas a um grupo de proteínas e, realizadas com um número limitado de genomas microbianos. Estabelecendo assim, o chamado subsistema povoado. Posteriormente, são feitas análises comparativas e de localização de genes (acoplamento funcional) para estender os subsistemas a outros genomas, isso leva ao estabelecimento e definição de grupos de proteínas que desempenham o mesmo papel funcional em uma variedade de organismos (RAMY et al., 2012; WILKE et al., 2012). Assim, a inclusão ou incorporação de um gene, num subsistema é determinada pelo papel funcional atribuído a ele; do modo que, cada proteína incluída nesse subsistema possui uma função.

Deve-se ressaltar que, na plataforma MG-RAST, a anotação dos dados genômicos é realizada através da retificação dos subsistemas, evento realizado manualmente por pessoal experiente de FIG (Fellowship for Interpretation of Genomes Families), fato realizado com base, nos genomas de referência disponíveis nas bases de dados globais. Deste modo, as proteínas são associadas a um papel funcional ou mais, e todos os membros da mesma família, conhecidos como FIG-fams, têm o mesmo papel funcional, mesmo que pertençam a variantes divergentes. Dado que, as FIG-fams fornecem dados acessíveis ao público, é o componente central para a anotação automatizada do servidor MG-RAST. Portanto, os subsistemas funcionais são inferidos pela busca de similaridade de sequência, em relação ao banco de dados de anotações de subsistemas SEED.

Resultados e discussão

Utilizando a plataforma HiscanSQ da Illumina, para o sequenciamento, foram obtidas em média 30 milhões de sequências de dados brutos de cada amostra de solo de horta. A tabela 2 mostra o número de leituras antes após

o pré-processamento, seu tamanho médio, o conteúdo de % GC por metagenôma, no qual não houve variação significativa no conteúdo entre os metagenômas analisados. Obtendo-se valores Phred entre 28 e 40, no programa FastaQC e, sugerindo uma confiabilidade de 99.9%.

Tabela 2. Características das sequências de DNA metagenômico das amostras de solo da horta. Valores de dados brutos e pós pré-processamento de controle de qualidade, gerado pelo portal MG- RAST.

Identificação o amostra	Número de leituras dado bruto	Tamanho médio de leitura dado bruto	Número de leituras após controle de qualidade	Tamanho médio de leitura após controle de qualidade	Conteúdo o médio de % GC
H1A	26.576.794	95 bp	24.297.783	97bp	63 _± 10
H2A	15.741.258	95 bp	14.278.342	97 bp	63 _± 10
H3A	37.863.312	95 bp	34.058.667	97 bp	64 _± 10
H1S	30.259.735	95 bp	27.624.387	97 bp	63 _± 10
H2S	29.203.138	95 bp	26.45.787	97 bp	63 _± 10
H3S	31.868.759	95 bp	29.045.453	97 bp	63 _± 10

No processamento das leituras de sequências resultantes que envolve: o corte de qualidade, a quantificação padrão interna, a identificação e remoção de sequencias e, finalmente, a anotação proteica, o portal MG-RAST usa o programa FragGeneScan para predizer potenciais genes codificadores de proteínas e, depois o algoritmo BLAT contra a base de dados não redundante M5nr; apresento os dados estatísticos para cada metagenôma como segue nas figuras 1a a 1f.

- Amostra H1A



Figura 1a. Diagrama de análises estatística amostra H1A. De um total de 26.576.794 sequências submetidas ao controle de qualidade, 24.297.783 correspondentes ao 89.5% das sequências, apresentaram regiões codificadoras de proteínas. Das quais, 2.279.011 sequências, falharam no controle de qualidade e, 55.035 sequências estiveram identificadas como leituras duplicadas artificiais, correspondendo ao 0,2% do total.

- Amostra H2A



Figura 1b. Diagrama de análises estatística amostra H2A. De um total de 15.741.258 sequências submetidas ao controle de qualidade, 14.278.342 correspondentes ao 89.2% das sequências, apresentaram regiões codificadoras de proteínas. Das quais, 1.462.916 sequências, falharam no controle de qualidade e, 32.044 sequências, estiveram identificadas como leituras duplicadas artificiais, correspondendo ao 0,2% do total.

- Amostra H3A



Figura 1c. Diagrama de análises estatística amostra H3A. De um total de 37.863.312 sequências, submetidas ao controle de qualidade, 34.05.667 correspondentes 89.0% das sequências apresentaram regiões codificadoras de proteínas. Das quais 3.804.645 sequências, falharam no controle de qualidade e, 86.643 sequências estiveram identificadas como leituras duplicadas artificiais, correspondendo ao 0,2% do total.

- Amostra H1S



Figura 1d. Diagrama de análises estatística amostra H1S. De um total de 30.259.735 sequências submetidas ao controle de qualidade, 27.624.387 correspondentes ao 89.2% das sequências apresentaram regiões codificadoras de proteínas. Das quais 2.635.348 sequências, falharam no controle de qualidade e, 61.706 sequências estiveram identificadas como leituras duplicadas artificiais, correspondendo ao 0,2% do total.

- Amostra H2S



Figura 1e. Diagrama de análises estatística amostra H2S. De um total de 29.203.138 sequências submetidas ao controle de qualidade, 26.450.787 correspondentes ao 89.2% das sequências apresentaram regiões codificadoras de proteínas. Das quais 2.752.351 sequências, falharam no controle de qualidade e, 55.414 foram identificadas como leituras duplicadas artificiais, correspondendo ao 0,2% do total.

- Amostra H3S



Figura 1f. Diagrama de análises estatística amostra H3S. De um total de 31.868.759 sequências submetidas ao controle de qualidade, 29.045.453 correspondentes ao 89.2% das sequências apresentaram regiões codificadoras de proteínas. Das quais 2.823.306 sequências, falharam no controle de qualidade e, 58.309 foram identificadas como leituras duplicadas artificiais, correspondendo ao 0,2% do total.

As análises dos metagenômas, usando as diferentes bases de dados disponíveis no portal MG- RAST, demonstraram que entorno de 89% das sequências, para todos os conjuntos de dados, apresentaram regiões codificadoras para proteínas (ORFs). Portanto, foram anotadas como proteínas com função conhecida e igualmente, atribuíveis a categorias funcionais. Deduzindo que, os dados são robustos e confiáveis para afrontar o trabalho na procura de atribuição funcional específica.

Com o propósito de examinar o potencial metabólico revelado nas amostras do solo da horta. A atribuição das sequências, em categorias de sub-sistema, foi realizada pela busca de similaridade por BlastX entre as leituras e a base de dados SEED. A atribuição do subsistema usado banco de dados de referência SEED, foi feita com um valor de corte *E-value* de 10^{-5} .

As análises funcionais dos metagenômas estudados, apresentaram resultados altamente similares. Essas análises revelaram em média uma distribuição funcional da seguinte forma: 60.6% das sequencias estão envolvidas em processos metabólicos, 17.5% em processamento da informação genética, 15.6% em processamento de informação ambiental e 4.1% de processos celulares (Figura 2).

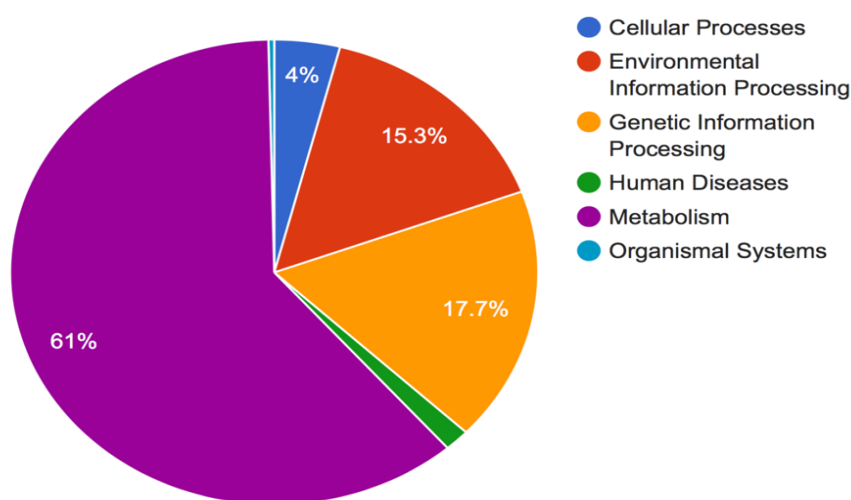
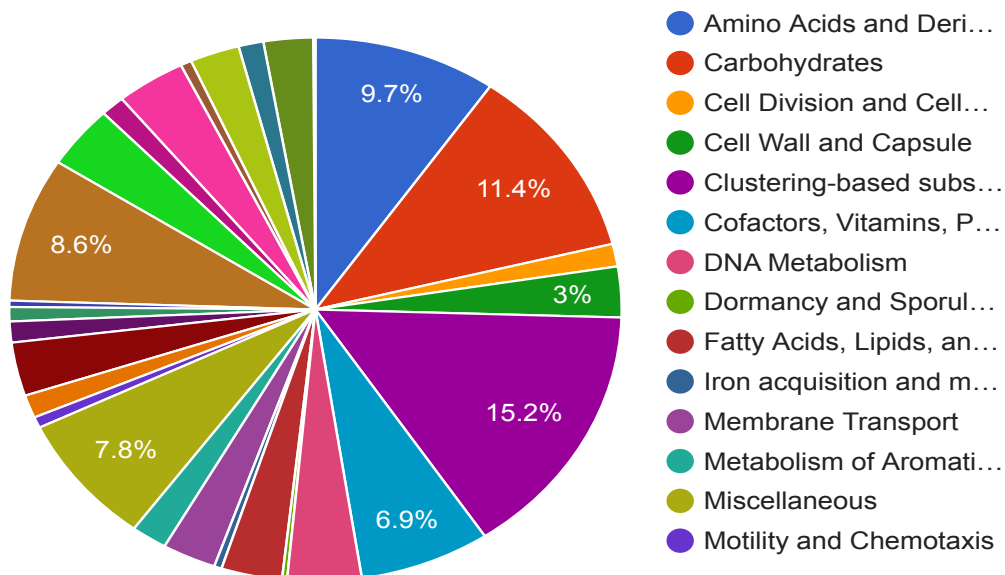
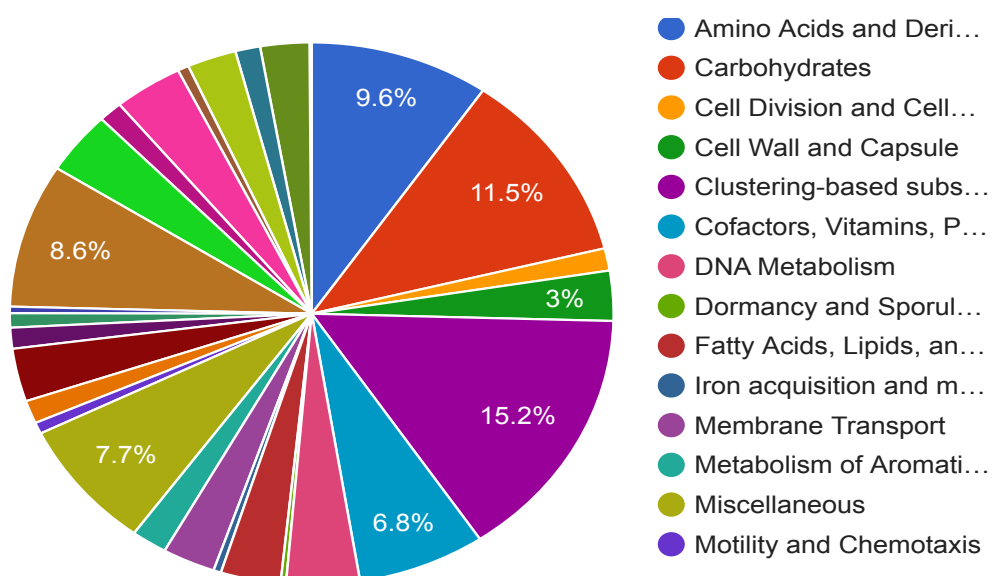


Figura 2. Estimativa em porcentagens da distribuição funcional, dos metagenômas analisados, usando a ferramenta KO no portal MG-RAST

O maior número de sequências, estiveram atribuídas ao metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos e derivados, metabolismo protéico, cofatores e vitaminas. Os metagenômas analisados, apresentaram uma alta similaridade entre eles, exibindo porcentagens com pouca variação entre eles (Figura 3 a-b).



3a



3b

Figura 3 a-b. Os gráficos ilustram a similaridade entre os metagenômas do solo da horta, a porcentagem de proteínas obtidas e a atribuição das categorias funcionais baseado nos subsistemas do portal MG-RAST.

Os levantamentos feitos para as enzimas: myo-inositol-hexakisfosfato 3-fosfohidrolase e myo-inositol-hexakisfosfato 4-fosfohidrolase, mostraram um grande numero de sequencias relacionadas, com homologia igual ou superior ao 80%.

Nas tabelas 3 e 4 se apresentam as sequências associadas a genes de interesse biotecnológico, as porcentagens de identidade, assim, como os principais microrganismos associados, destacando-se com relação a fitase E.C.3.1.3.8 o *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 com um 100% de identidade. A anotação funcional, foi baseada na tecnologia de subsistemas SEED, empregada no portal MG-RAST, utilizando *Cluster of Orthologous Groups COG*, o *KEGG Orthology* e a ferramenta *Best hit classification*. Observa-se que uma grande parte dos gêneros bacterianos envolvidos na manifestação destas enzimas, também tiveram relevante presença em estudos anteriores feitos ligados aos ciclos biogeoquímicos (MENEGHINE, 2016).

Tabela 3. Sequências associadas a genes de interesse biotecnológico, selecionados por análises funcional *in silico*, utilizando a plataforma MG-RAST, envolvidos com a fitase E.C.3.1.3.8 e, os microrganismos associados.

Fitase E.C. 3.1.3.8

Amostra	Ref-sequencia	% Identidade	ID gene/ proteína NCBI	Organismo
H1A	YP_003593415.1	90	Cseg_2337 / ADG10797	<i>Caulobacter segnis</i>
	YP_001869795.1	91	Npun_R6594 / ACC84852	<i>Nostoc punctiforme</i>
H2A	YP_003593415.1	94	Cseg_2337 / ADG10797	<i>Caulobacter segnis</i>
	YP_003341049.1	91	Sros_5553 / 8668847	<i>Streptosporangium roseum</i>
	YP_001869795.1	93	Npun_R6594 / ACC84852	<i>Nostoc punctiforme</i>
H3A	YP_003341049.1	93	Sros_5553 / 8668847	<i>Streptosporangium roseum</i>

	YP_633476.1	94	MXAN_5326 / 4106462	<i>Myxococcus xanthus</i>
	YP_001869795.1	93	Npun_R6594 / ACC84852	<i>Nostoc punctiforme</i>
H1S	YP_001421557.1	100	KSO_009520 / AGF27399	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	YP_003493896.1	94	M444_32765 / AKL69387	<i>Streptomyces scabies</i>
	YP_003593415.1	88	Cseg_2337 / ADG10797	<i>Caulobacter segnis</i>
H2S	YP_003593415.1	75	Cseg_2337 / ADG10797	<i>Caulobacter segnis</i>
H3S	YP_003120734.1	88	Cpin_1035 ACU58533	<i>Chitinophaga pinensis</i>
	YP_001869795.1	89	Npun_R6594 / ACC84852	<i>Nostoc punctiforme</i>
	YP_002516726.1	88	CCNA_01353 / 7331808	<i>Caulobacter crescentus</i>
	YP_003490693.1	94	SCAB_51081 / 8841926 / CBG72151	<i>Streptomyces scabiei</i>
	YP_288962.1	96	Tfu_1627 / 3580405 AAZ55662	<i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)
H3A	YP_002280726.1	94	Rleg_1295 / ACS55587	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
	YP_002280726.1	100	Tfu_1627 / 3580405 AAZ55662	<i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)

Tabela 4. Sequências associadas a genes de interesse biotecnológico, selecionados por análises funcional *in silico*, utilizando a plataforma MG-RAST, envolvidos com a celulase E.C.3.2.1.4 e, os organismos associados.

Celulase E.C. 3.2.1.4

Amostra	Ref-sequencia	% Identidade	ID gene/ proteína NCBI	Organismo
H1S	YP_003490693.1	90	SCAB_51081 / CBG72151	<i>Streptomyces scabies</i>

	YP_001768030.1	85	M446_0105 / ACA14690	<i>Methylobacterium</i> <i>sp. 4-46</i>
	YP_001665844.1	85	Thebr_1897 /10 164181 /ADV80426	<i>Thermoanaerobacte</i> <i>r brockii subsp. finni</i> <i>Ako-1</i>
H2S	YP_303778.1	94	Mbar_A0214 / AAZ6919	<i>Methanosarcina</i> <i>barkeri str. fusaro</i>
	YP_288962.1	97	Tfu_1627 / 3580405 AAZ55662	<i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)
	YP_003490693.1	93	SCAB_5108 /8841926 / CBG7215	<i>Streptomyces</i> <i>scabiei</i>
	YP_954306.1	92	Mvan_3505 / ABM14300	<i>Mycobacterium</i> <i>vanbaalenii</i>
	YP_003099957.1	93	Amir_2166 / ACU36111	<i>Actinosynnema</i> <i>mirum DSM 43827</i>
	NP_770007.1	100	blr3367 / 10506 03 NP_770007 /	<i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum USDA</i> <i>110</i>
H2A	YP_001197264.1	81	Fjoh_4946 / ABQ07945	<i>Flavobacterium</i> <i>johnsoniae</i>
	YP_003490693.1	94	SCAB_51081 /8841926 / CBG72151	<i>Streptomyces</i> <i>scabiei</i>
	YP_288962.1	96	Tfu_1627 / 3580405 AAZ55662	<i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)
H3A	YP_002280726.1	94	Rleg_1295 / ACS55587	<i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum bv.</i> <i>trifolii</i>
	YP_002280726.1	100	Tfu_1627 / 3580405 AAZ55662	<i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)
H1A	YP_003321552.1	100	Sthe_3330 / ACZ40730	<i>Sphaerobacter</i> <i>thermophilus</i>
	YP_003099957.1	93	Amir_2166 / ACU36111	<i>Actinosynnema</i> <i>mirum DSM 43827</i>

Consequentemente, nas análises das sequências relacionadas com o metabolismo de carboidratos, pode-se ressaltar a presença da enzima E.C. 3.2.1.4 endoglucanase, presente nos metagenômas analisados (Figura 3). De igual forma, nos resultados das enzimas implicadas no metabolismo do inositol fosfato, vale destacar a enzima E.C. 3.1.3.8 fitase. (Figura 4).

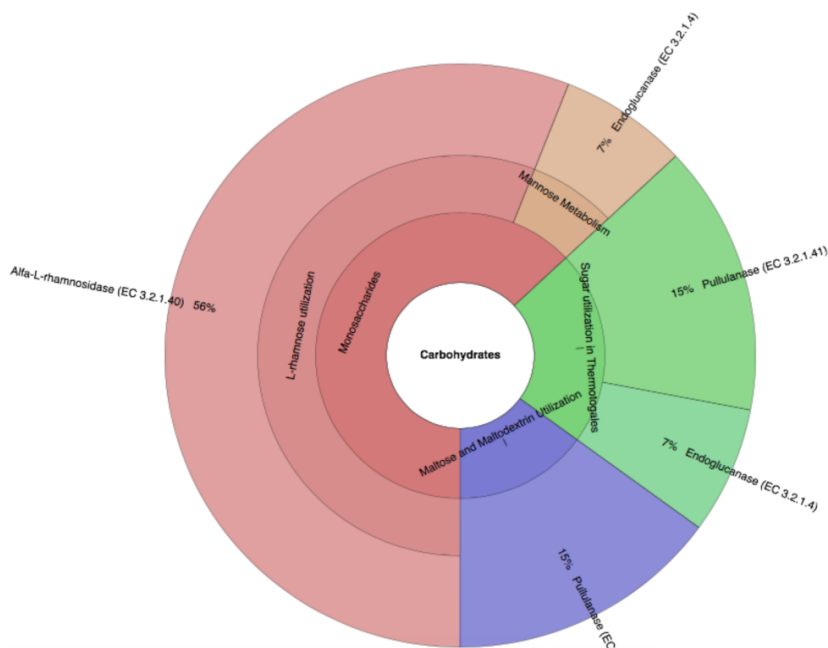


Figura 3. Enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, figura preparada pelo programa de visualização interativa Krona incorporado no portal MG-RAST.

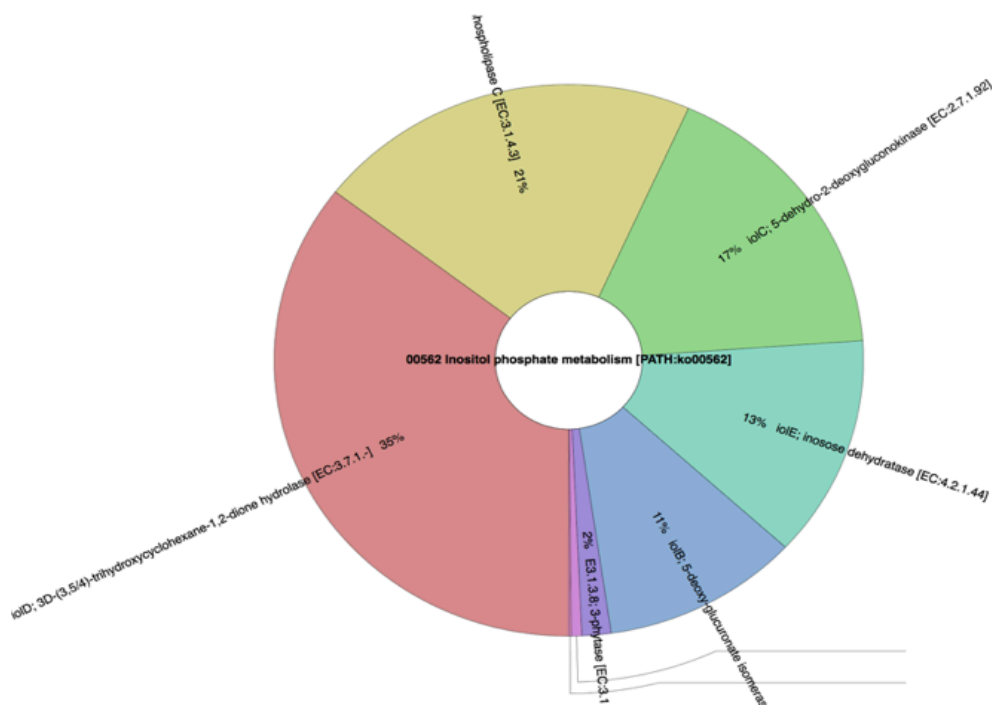


Figura 4. Enzimas implicadas no metabolismo do inositol fosfato produzida através da ferramenta de visualização interativa Krona incorporado no portal MG-RAST.

Com relação aos componentes bioativos, a tabela 5 expõe a existência de genes codificadores de fenazinas (metabolito secundário) e seus percentagens de identidade. Assim, como os principais microrganismos envolvidos na sua produção e ressaltados nas análises metagenômicas das amostras de solos estudadas. As fenazinas são metabolitos, que têm diversos efeitos antagônicos diretos sobre os procariotos e, efeitos diretos e indiretos incluindo a modificação de várias respostas celulares nos eucariotos e seus tecidos. Devido a que podem server como lançadeiras de elétrons que alternam aceptores terminais. Desse modo conseguem modificar os estados redox celulares (MOORE et al., 2006). Também atuam como sinalizadores celulares que regulam os padrões de expressão gênica e contribuem para a formação de biofilme (CAICEDO et al., 2015).

As análises dos metagenômas do solo da horta permitiram observar a presença dos diversos tipos de genes abrangidos no metabolismo para fenazinas como PhzS, PhzA, PhzE, PhzF, PhzH e PhzD, destacando-se a abundancia da PhzF (Figura 5).

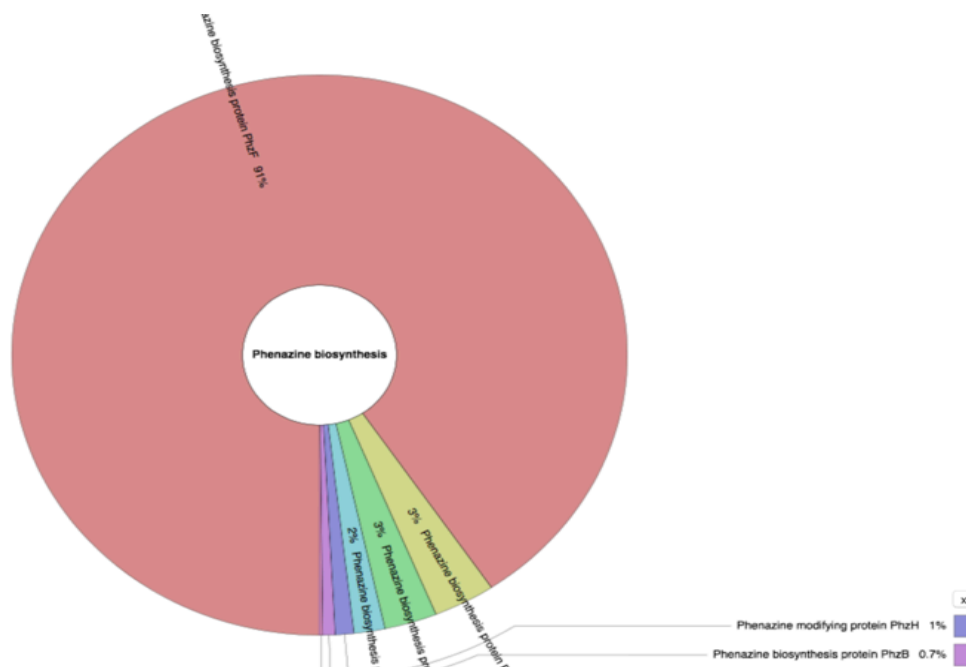


Figura 5. Distribuição em porcentagem, das diferentes sequencias associadas as fenazinas presentes. Figura elaborada com a ferramenta de visualização interativa Krona acoplada ao portal MG-RAST.

Tabela 5. Sequências associadas a genes de interesse biotecnológico selecionados por análises funcional *in silico*, utilizando a plataforma MG-RAST, implicados na biossíntese de fenazinas e, os organismos relacionados com sua geração.

Fenazinas				
Amostr a	Ref-sequencia	% Identidad e	ID gene/ proteína NCBI	Organismo
H2A	YP_00134874 5.1	81	GI:751334354/ WP_04102545 2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7
	YP_00243832 1.1	84	GI:501653619/ WP_01261354 7.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58
	YP_00123346 7.1	94	GI:500475107/ WP_011941447.1	<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5
H2S	YP_00311208 0.1	94	GI:502435647/ WP_012785533.1	<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928
	NP_386147.1	92	GI:489625565/ WP_00353000 5.1	<i>Sinorhizobium meliloti</i> BL225C
	YP_00339217 6.1	93	GI:283946057/ ADB48801.1	<i>Conexibacter woesei</i> DSM 14684
	YP_481067.1	81	GI:499754020 / WP_01143475 4.1	<i>Frankia</i> sp. Ccl3
	YP_988029.1	81	GI:500130928/ WP_01180693	<i>Acidovorax</i> sp.

		3.1	JS4
NP_948521.1	94	GI:499472087/ WP_01115872 7.1	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009
YP_00351045 7.1	92	GI:502781959/ WP_01301693 5.1	<i>Stackebrandtia nassauensis</i> DSM 44728
YP_00153557 8.1	95	GI:501132110/ WP_01218089 7.1	<i>Salinispora arenicola</i> CNS- 205
YP_00150633 0.1	90	GI:521295323 / WP_020459591.1	<i>Frankia sp.</i> EAN1pec
YP_00179255 7.1	92	GI:501316904/ WP_01234853 9.1	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6
YP_00105031 1.1	83	GI:500172253/ WP_01184667 8.1	<i>Shewanella baltica</i> OS155
NP_902333.1	84	GI:499448746/ WP_01113621 0.1	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472
ZP_00997320. 1	93	GI:49746412 / WP_00977832 2.1	<i>Janibacter sp.</i> HTCC2649
YP_00179255 7.1	90	GI:501316904/ WP_01234853 9.1	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6
YP_163535.1	90	GI:499560750 / WP_011241533.1	<i>Zymomonas mobilis</i> subsp.

mobilis ZM4

YP_00331387 1.1	94	GI:502629464/ WP_01286610 6.1	<i>Sanguibacter keddiei</i> DSM 10542
YP_00101938 4.1	90	GI:500151785/ WP_01182778 8.1	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1

O destaque do metabolito secundário fenazinas na análise metagenômico, poderia estar relacionado com a alta disponibilidade nutricional do composto, o que favorece a presença de espécies bacterianas catadoras oportunistas (CANCELADO et al., 2014). Porquanto que, essas bactérias usam como estratégia principal, para garantir a sua adaptação, defesa e competitividade, a produção e excreção no ambiente de metabólitos secundários pigmentados conhecidos como fenazinas (MOORE et al., 2006).

Conclusão

A ampla porcentagem de ORFs encontradas, no estudo das amostras analisadas, permitiu observar o alto potencial biotecnológico com possibilidade de ser explorado no futuro. Assim, a identificação de novos catalisadores e compostos com atividade bactericida e fungicida irá melhorar os processos existentes e conduzirá ao design de novos processos para a fabricação de produtos inovadores, tornando-se alternativas para os inúmeros processos atuais que implementam biotecnologia.

Referências bibliográficas

ACHARYA, A.; JOSHI, D.R.; SHRESTHA, K.; BHATTA. D.R. Isolation and screening of thermophilic cellulolytic bacteria from compost piles. Natural Product Chemistry Research Laboratory, **Nepal Academy of Science and Technology (NAST)** Khumaltar, Lalitpur, Nepal.2012

ANTUNES, L. P. et. al. Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and

metatranscriptomics **Scientific Reports** 6, Article number: 38915 (2016)
doi:10.1038/srep38915.

BASHIR, K. et. al. Transcriptomic analysis of rice in response to iron deficiency and excess. **Rice** 7 18 10.1186/s12284-014-0018-1, 2014

BUFFALO, V. Scythe - **A Bayesian adapter trimmer**. [s.l.: s.n.].
<<https://github.com/vsbuffalo/scythe>>

CAICEDO J.C.; VILLAMIZAR C.S.; FERRO M.I.T.; KUPPER K.C. ; FERRO J.A. Bacteria from the citrus phylloplane can disrupt cell–cell signalling in *Xanthomonas citri* and reduce citrus canker disease severity. **Plant Pathology** 2016, 65,782-791

CANCELADO S.V.; CEPEDA J.C.C.; FERNANDEZ C.C.; VARANI A.M.; E CARARETO A. L.M. Microbiological quality assessment of a compost produced from animal waste and vegetables. **WIT Transactions on Ecology and The Environment**, vol 191, p.1469- 1479, 2014. doi:10.2495/SC141242 2014

CARICASOLE, P.; PROVENZANO, M.R.; HATCHER, P.G.; SENESI, N. Evolution of organic matter during composting of different organic wastes assessed by CPMAS C-13 NMR spectroscopy. **Waste Manage** 31:411–415, 2011

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

CHANDER, Y.; KUMAR, K.; GOYAL, S.M.; GUPTA, S.C.; Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. **J Environ Qual** 34:1952–1957, 2005

CHEN, L.; LUO. Y.; XU, J.; YU, Z.; ZHANG, K.; BROOKES, P.C. Assessment of bacterial communities and predictive functional profiling in soils subjected to short-term fumigation-incubation. **Microb Ecol**. 72:240–51. 2016

COWIESON, A.J.; RAVINDRAN, V. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. **Br Poult Sci**. 49(1):37-44, 2008

CRAIG, J. W.; CHANG, F. Y.; KIM, J.H.; OBIAJULU, S. C.; BRADY, S. F. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. **Appl Environ Microbiol.** 76:1633–41. 2010

DVORÁKOVÁ, J. Phytase: sources, preparation and exploitation. **Folia Microbiologica**; 43(4):323-338. 1998.

FENG, C. L.; ZENG G. M.; HUANG, D.L.; HU, S.; ZHAO, M.H.; LAI, C.; HUANG, C.; WEI, Z.; LI, N. J. Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting. **Process Biochem** 46:1515–1520, 2011

FERNANDEZ-ARROJO, L.; GUAZZARONI, M.-E.; LOPEZ-CORTES, N.; BELOQUI, A. and FERRER, M. Metagenomic era for biocatalyst identification. **Curr Opin Biotechnol** 21, 725–733, 2010

FERRER, M.; GOLYSHINA, O. V.; CHERNIKOVA, T. N.; KHACHANE, A. N.; REYES-DUARTE, D.; SANTOS, V.A.; et. al. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environ Microbiol** 7, 2005, 1996–2010.

FERRER, M. et. al. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. **Microb Biotechnol.** 9(1):22-34. 2016

HARUN, N. A. F.; BAHARUDDIN, A. S.; ZAINUDIN, M.H.M.; BAHRIN, E.K.; NAIM, M. N.; ZAKARIA, R. Cellulase production from treated oil palm empty fruit bunch degradation by locally isolated *Thermobifida fusca*. **Bio Resources** 8:676–687, 2013

HAO, T. et. al. Identification of Novel Phytase Genes from an Agricultural Soil-Derived Metagenome **J. Microbiol. Biotechnol.** 24(1), 113–118, 2014

HUANG, H.; SHI, P.; WANG, Y.; LUO, H.; SHAO, N.; WANG, G. et. al. Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. **Appl. Environ. Microbiol.** 75 1508–1516, 2009.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnol. Adv.** 29, 468–482, 2011.

JORQUERA, M.; MARTÍNEZ, O.; MARUYAMA F., MARSCHNER P., DE LA LUZ MORA M. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. **Microbes Environ.** 23 182–191. 2008.

KILANI-FEKI, O. et. al. Antifungal activities of an endophytic *Pseudomonas fluorescens* strain Pf1TZ harbouring genes from pyoluteorin and phenazine clusters. **Biotechnol Lett** 32:1279–1285, 2010

KNIGHTS, D.; PARFREY, L. W.; ZANEVELD, J.; LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. Human associated microbial signatures: examining their predictive value. **Cell Host Microbe.** 10:292–296. 2011

KO, K.C.; LEE, J.H.; HAN, Y.; CHOI, J.H.; SONG, J.J. A novel multifunctional cellulolytic enzyme screened from metagenomic resources representing ruminal bacteria. **Biochem Biophys Res Commun.** Nov 22;441(3):567-72. 2013

KONIETZNY, U.; GREINER, R.; Bacterial phytase: Potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. **Brazilian J. Microbiol.** 35, 11-18. 2004

MARTINS, L et al., Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms **Plos One.** 2013; 8(4): e61928.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2011

MATTHIAS, H. et al. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. **Science** 28 Vol. 331, Issue 6016, pp. 463-467. 2011

MENEGHINE, A. K. Análise metagenômica e perfil biotecnológico de microrganismos de solo e água de uma área agrícola com adubação orgânica. 2016 M541a Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

MEYER, F., OVERBEEK, R.; RODRIGUEZ, A. FIGfams: yet another set of protein families. **Nucleic Acids Res.** 37, 6643–6654. 2009

MOORE, E. R.B.; TINDALL, B.J.; MARTINS, DOS SANTOS V.A.P.; PIEPER, D.H.; JUAN-RAMOS, L.; PALLERONI, N. J. Nonmedical: *Pseudomonas* **The**

Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria vol 6, p 646-704, 2006.

MUKHAMETZIANOVA, A. D.; AKHMETOVA, A. I.; SHARIPOVA, M.R. Microorganisms as phytase producers. **Mikrobiologiya** 81:291–300. 2012

OVERBEEK, R. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Res.** gkt1226 .2013.

PAL, B. H.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiol** 134:307–31, 2004

PATEL, K.J.; SINGH, A. K.; NARESHKUMAR, G.; ARCHANA, G. Organic-acid-producing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). **Appl Soil Ecol** 44(3):252–261, 2010

RAMY, K. et. al. SEED Servers: High-Performance Access to the SEED Genomes, Annotations, and Metabolic Models. **PlosONE**; 7 (10), 2012

RAWAT, S.; JOHRI, B. N. Role of thermophilic microflora in composting. In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y (eds) Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology, **2nd edn. Biotechnology of thermophiles**, Springer, pp 137–170 2013

RAWAT, S.; AGRAWAL, P.K.; CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B. N. Microbial diversity and community dynamics of mushroom compost ecosystem. In: Satyanarayana T, Johri BN (eds) I.K. **International Pvt. Ltd.** New Delhi, p 1027. 2005

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

STALLINGS, J.H.; Soil produced antibiotics-plant disease and insect control. **Bacteriol Rev** 18:131–146, 1954

TAN, H.; WU, X.; XIE, L.; HUANG, Z.; GAN, B.; PENG, W. Cloning, Overexpression, and Characterization of a Metagenome-Derived Phytase with Optimal Activity at Low pH. **J Microbiol Biotechnol.** Jun;25(6):930-5. 2015

TCHIGVINTSEV, A.; TRAN, H.; POPOVIC, A.; KOVACIC, F.; BROWN, G.; FLICK, R.; et al. The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 99, 2165–2178, 2015

THACKER, P.A.; ROSSNAGEL, B. G.; RABOY, V.; Effect of phytase supplementation on phosphorus digestibility in low-phytate barley fed to finishing pigs. **Arch. Anim. Nutr.** 58:61–68. 2004

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M.; Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresour Technol.** 72:169–183, 2000

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

VOGET, S.; STEELE, H.L.; STREIT, W.R. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. **J Biotechnol**, 126, 26–3, 2006

WILKE, A et al., The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. **BMC Bioinformatics** 2012; 13:141

YAO, M.Z.; LU, W.L.; CHEN, T.G.; WANG, W.; FU, Y.J.; YANG, B.S. et. al. Effect of metals ions on thermostable alkaline phytase from *Bacillus subtilis* YCJS isolated from soybean rhizosphere soil. **Ann Microbiol**, 64 (3)) 1123-1131. 2013

YEH, Y. F.; CHANG, S.C.; KUO, H. W.; TONG, C. G.; YU, S.M. A metagenomic approach for the identification and cloning of an endoglucanase from rice straw compost. **Gene**, V 519, 2. 2013

CAPITULO 3 Bactericidal effect of entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* against *Xanthomonas citri* reduce citrus canker disease severity

Sonia Villamizar, and **Jesus Aparecido Ferro**, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal. Brasil **Juan Carlos Caicedo**, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Postgraduate Program in Agricultural Microbiology, Jaboticabal. Brazil. - Santander University (UDES), Industrial Microbiology Program, Bucaramanga. Colombia. **Norberto Peporine**, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto. Brazil. **Lucia C. Alves**, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal. Brazil.

Abstract

The bacterium *Pseudomonas entomophila* has been identified as an exceptional specie among *Pseudomonas* genus, capable to naturally infect and kill insects at least three different orders. Once *P. entomophila* was ingested it leaded an irreversible gut damage resulting from a global translational blockage, it which impairs both immune and repair systems in the insect intestine. Currently there is not information regarding bactericidal activity of *P. entomophila* against phytopathogenic bacteria. In this study by depending and independent culture approaches, it has been isolated and identified from soil samples, a bacterial strain that have 99.5 % 16S rRNA gene sequence similarity with *P. entomophila*. This bacterium displayed a great activity against *Xanthomonas citri* subsp *citri* (Xcc), etiological agent of citrus canker disease. The antagonist potential of isolated bacterium against Xcc and its ability to reduce severity disease was assessed both *in vitro* and *in planta*. Our findings shown a significant reduction in the number of canker lesions, after 21 days post infection in susceptible citrus leaves infected by pressure infiltration with a mixture of *P. entomophila* and Xcc. Collective action of *P. entomophila* factors as DKPs production and T6SS could be necessaries for the successful biological control of citrus canker disease. These results suggest that isolated strain characterized as *P. entomophila* could be a promising biocontrol agent against *Xanthomonas citri* subsp *citri*, in addition

due to its entomopathogenic ability could be a potential biocontrol agent against vector borne phytopatogens as *Xylella fastidiosa* and *Candidatus liberibacter*.

Introduction

Sustained growth in world population has forced the agricultural producer to implement aggressive practices against environment (i.e. indiscriminate use of pesticides and chemical fertilizers), in order to respond to rising demand for cereals, sugarcane, tuber crops, cotton and fruits.

The increasing gap between supply and demand and the unfavorable impact in the environment has encouraged to researchers to develop alternative strategies, searching to promote a sustainable agriculture. Several bacterial genera soil inhabitants or plant associated bacteria, display an extremely versatile secondary metabolism, proving to be appreciated sources of many diverse metabolites with valuable biological activities, including antibiotic activity (Raaijmakers and Mazzola 2012). *Pseudomonas* is a bacterial genus, characterized by its great environmental ubiquity, which is due to extraordinary ability to produce in *situ* wide diversity of secondary metabolites (i.e. phenazines, pyoluteroina or lipopeptides), further, to use a wide diversity of organics molecules as source of energy (Wu et al., 2010).

Some *Pseudomonas* species are phytopathogens producing leaf spots, wilt and blights, others several species have the capacity to establish as natural inhabitants of rizhosphera and phyllosphere, acting both as commensals or beneficial to their host. Thus, they lead suppression of pathogens infection and/or directly promoting its growth and fitness (Mercado and Bakker 2007). *Pseudomonas* beneficial species display traits that enable them to act as effective biological control agents (BCAs) against several phytopathogens.

Among these traits the most commonly shared by a broad *Pseudomonas* strains are: (I) great colonizing ability of plant surfaces, internal plant tissues and phytopathogen structures (i.e. hyphae) (Mercado-Blanco and Bakker 2007); (II) Capability to produce several types of antibiotics granting them additional advantage to compete with local microbiota and

phytopathogens (Weller et al., 2007; Gross and Loper 2009); (III) Ability to trigger resistance responses in host plants (De Vleeschauwe et al., 2008; Djavaheeri et al., 2012). Direct mechanisms as antagonism over pathogen (i.e. antibiosis) or indirect mechanisms as competition for nutrients (e.g. siderophores production).

Besides, induction of systemic resistance responses, actively participate in phytopathogenic disease suppression by *Pseudomonas* bacteria. *Pseudomonas* strains most usually recognized for their biocontroller activity against phytopathogenic microorganisms both eukaryotes and prokaryotes are: *P. flourecens*, *P. protegens*, *P. clororaphis* and *P. putida* (Vlassak et al., 1992; Ramette et al., 2011; Hökenberg et al., 1997; Gu and Mazzola 2001).

The bacterium *Pseudomonas entomophila* has been identified as an exceptional specie among *Pseudomonas* genus, which is capable to naturally infects and kills insects at least three different orders. *P. entomophila* was originally isolated from a *Drosophila melanogaster* female (Vodovar et al., 2005). Once *P. entomophila* was ingested it leded an irreversible gut damage resulting from a global translational blockage, it which impairs both immune and repair systems in the insect intestine. Thanks to the publication of *P. entomophila* complete genome sequence, it was possible to elucidate the lifestyle of *P. entomophila*.

As already mention before as the others *Pseudomonas* strains, *P. entomophila* genome comprises a large set of genes responsible for the adaptation to numerous carbon sources (Vodovar et al., 2005), suggesting that *P. entomophila* is a bacterium highly adaptable able to fit to soil, rizosphere, phyllopheres, water and even polluted soils. Contrary to what is commonly believed that positive interaction predominates in a microbial world, recent studies has shown that cooperation among bacterial species is relatively rare and competition is the dominant relation between microbes that share an ecological niche (Foster and Thomas 2012).

This factor is determining in ecological niche such as phyllosphere where the resource availability is intensely reduced. Because *Pseudomonas* and *Xanthomonas* from the Gammaproteobacteria class, were the bacterial

genera most consistently detected by metagenomic approaches in several phyllopheres (Vorholt 2012); it is reasonable to think that there is a great competitive relationship between these two bacterial genera. Since their initial isolation, much of the research developed in *P. entomophila* has focused on the study of its interaction with the insect and to understand its entomopathogenicity.

Only few studies have focused on study of properties other than entomopathogenic ability. *P. entomophila* strain isolated from rizosphere of red pepper in South Korea display capacity to act as a plant growth promoter providing resistance to several stresses factors (Kamala-Kannan et al., 2010). In a metagenomic study of Arctic soil samples, which were highly contaminated with diesel, *P. entomophila* was repeatedly identified as former of local microbiota suggesting a potential application in bioremediation processes (Yergeau et al., 2012).

To best of our knowledge, currently there is not information regarding bactericidal activity of *P. entomophila* against phytopathogenic bacteria. In this study by depending and independent culture approaches, it has been isolated and identified from soil samples, a bacterial strain that have 99.5 % 16S rRNA gene sequence similarity with *P. entomophila*. This bacterium displayed a great bactericidal activity against *Xanthomonas citri* subsp *citri* 306 (Xcc 306), etiological agent of citrus canker disease (da Silva et al., 2002). The main goals of this study were to assess the antagonist potential of isolated bacterium against Xcc 306 *in vitro* and *in planta*, as well to evaluate its ability to reduce citrus canker disease severity, in order to provide an alternative to traditional copper treatment with significant environmental implication.

Materials and Methods

Soil Sampling

In the present study it has been used 12 soil samples took at depth between 0-20 cm belonging to São Paulo Zoo Park farm, São Paulo, Brazil, which were organic compost amendment in the last 5 years. The compost was made at the São Paulo Zoo Park composting facility from organic waste such as: tree

branches, leaves, grass, manure, beddings and food residues from about 400 animals species inhabitants of zoo (mammals, avian and reptiles).

Metagenomic DNA extraction, sequencing and functional screening

Metagenomic DNA has been extracted from 0.25g soil samples using Powersoil® DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), according to manufacturer instructions. DNA quality was evaluated by 260 nm/280 nm and 260 nm/230 nm ratios, final DNA concentration was measured by Qubit 3.0 flourometer using Qubit® dsDNA BR Assay Kit. Metagenomic DNA paired-end 100nt library has been constructed using the Illumina® TruSeq® DNA Sample Preparation Kits following the manufacturer instructions. After quality filtering by Scythe, Cutadapt and PrinSeq, unassembled raw reads have been submitted to analyze and perform functional screening on MG-RAST metagenomics analysis server (Meyer et al., 2008). Our findings were compared with the COG and SEED Subsystem databases to assess the prominent functions of major bacterial genera in samples.

Isolation and characterization of bacteria

In order to recover bacterial species of *Pseudomonas* genus from soil samples, selective and differential microbiological media culture have been used. 500 mg of each soil samples were homogenized in 5mL of 10mM phosphate buffer pH 7.0. Three ten-fold dilution series of this suspension were spread in modified King's B agar (Peptone 20 g/L, dipotassium hydrogen phosphate 1.5 g/L, magnesium sulfate 1.5 g/L, agar 15g/L and 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol 25mg/L) and modified King's A agar (Peptone 20 g/L, dipotassium hydrogen phosphate 1.5 g/L, magnesium chloride 1.5 g/L, agar 15g/L and 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol 25mg/L). Plates were incubated at 28 °C for 48 hours, subsequently plates were evaluated under UV light in order to evidence fluorescent pigment production.

Single colonies representing phenotypical variety were streaked onto petri dishes containing King's B agar; subsequently they were physiological and biochemistry characterized by API 20 NE test (bioMérieux), growth at 42 °C and growth on 6%, 7%, 8 % NaCl. For molecular bacterial characterization, genomic DNA was extracted by Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega). PCR-mediated 16S rRNA amplification products obtained using

the universal primers PA and PC5B (Table 1) were sequencing by 3730xl DNA sequencer; Applied Biosystems. The nucleotide sequences found were compared to the 16S rRNA sequence from the GenBank database using a nucleotide BLAST search. For those bacterial isolates whose 16S rRNA similarity level was below 98.6% were performed a new 16S rRNA amplification using internal primers (Table 1), in order to obtain accurate discrimination in the identity of bacterial isolated.

Table 1. Primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'- 3')	Reference
<i>fD1e</i>	agagtttgatcctggctcag	Weisburg et al., 1991
<i>rD1</i>	aaggaggtgatccagcc	Weisburg et al., 1991
*362f	CTCCTACGGGAGGCAGCAGT	Mena et al., 2006
*786f	AAGCGTGGGGAGCAAACAGG	Mena et al., 2006
*1203f	AGGTGGGGATGACGTCA	Mena et al., 2006

* Internal primers

Antibacterial ability against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in vitro and in plant assays

In vitro antibacterial assay was performed by disk diffusion technique (Bauer et al., 1966). Briefly, bacterium Xcc 306 was grown in nutrient broth (NB) to log phase (OD 600 0.5-0.7), suspension of Xcc 306 with final concentration of 10^8 CFU mL⁻¹ was adjusted in 10 mM MgCl₂. Sterile swab was soaked in this suspension and then it was streaked over entire surface of LB agar. Subsequently a sterile filter paper disk was soaked with 5 µL of each isolated bacterium at final concentration at 10^8 CFU mL⁻¹; this concentration was adjusted from each isolated bacterium that reached OD 600 = 1.5-1.8.

Then each disk was placed on surface of LB agar plates previously inoculated with Xcc 306. Plates were incubated at 29 °C, after 24 and 48 the plates (three replicates) were evaluated for growth inhibition halos. The assay was repeated as mention above, using the crude extract free of cells for each

bacterial isolation instead bacterial cells. These extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at different concentration (100µg 50µg and 25µg). DMSO has been used as negative control. Plates were incubated at 29 °C, after 24 and 48 h plates (three replicates) were evaluated for growth inhibition halos. For *in planta* assays was chosen *Citrus x limonia* as susceptible host due its higher sensitivity to Xcc 306. The assays were performed under controlled growth conditions at the Plant Laboratory, Technology Department FCAV/ Universidade Estadual Paulista, SP, Brazil. Infection method of leaf infiltration by pressure (without needle) was performed. All plants were grown in a growth chamber maintained at 28°C and with a photoperiod of 16 h. The antagonist bacteria tested were only those that showed a higher ability *in vitro* for Xcc 306 growth inhibition.

All plants were the same age at the time of inoculation; fully expanded immature citrus leaves of similar age were infected by infiltration pressure with needleless syringes containing both Xcc 306 and antagonist bacterial isolates. The bacterial strains were mixed just prior to infection and the final concentration was adjusted to 10^8 CFU mL⁻¹ in 10 mM MgCl₂ for each strain. MgCl₂ was injected as negative control and each antagonist bacteria were infiltrated in order to assay their potential virulence to citrus host. Any antagonist bacteria that display a minimal sign of virulence to host was rejected from study. The infiltrated leaves were photographed 21 days post- inoculation (DPI).

Canker lesions from five infiltrated leaves for every treatment were quantified 21 DPI, and the infected areas were calculated using IMAGEJ v. 1.48 (Schneider et al., 2012). Additionally, endophytic bacteria were isolated from infected citrus leaves 3 and 7 DPI by plating in king's B medium, in order to recover antagonist *Pseudomonas* bacteria, these recovered strains were identified by API 20 NE kit and 16S rRNA PCR amplification. The assays were performed in triplicate, and the statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA with post hoc testing (Bonferroni) using SPSS STATISTICS DESKTOP, v. 22.0 software (IBM).

MIC and MBC determination

In order to know the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) at which Xcc 306 growth is inhibited, crude extracts free of cells from antagonist bacteria whose displayed any bactericidal activity *in vitro* against Xcc 306 was assayed.

Briefly, overnight King's B grown cell culture of each antagonist bacteria isolated has been used to inoculated fresh King's B broth at volume 1:100, then it was incubated at 30°C with shaking (200 rpm) till reach OD 600 ~1.8, subsequently, the cells were removed by centrifugation (13000 g, 15 min, 4°C) and supernatant was extracted three time with 0.5 vol. ethyl acetate, this fraction was evaporated to dryness in rotary evaporator and the material were weighted and dissolved in DMSO. MICs of extracts were determined by macro dilution broth method following the standard protocols of CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute).

The final concentration of Xcc 306 used to inoculated 1 mL of NB was adjusted to 5×10^5 UFC/mL. Concentrations of 100, 50 and 25 µg/mL of each extract were added to tubes containing Xcc 306 and then were incubated at 30°C with shaking (200 rpm) by 48 h. At incubation times of 24 and 36 and 48 h, bacterial optical density of each test tube was measure and compared with our control i.e. 1 mL of NB inoculated simply with 5×10^5 UFC/mL of Xcc 306 under the same incubation conditions mention above. Minimal Bactericidal Concentration (MBC) for each treatment was determining by subculturing NB agar plates. Every experiment as performed in triplicate for each treatment.

Extraction, purification and characterization of putative bioactive compound

In order to analyze the bioactive compound present in the cells free crude extract, from each isolated antagonist bacteria, supernatant from overnight cell culture with $OD \geq 1.8$ was extracted three time with 0.5 vol. ethyl acetate, this fraction was evaporated to dryness in rotary evaporator and the material were weighted and dissolved in DMSO. In order to purify DMSO fraction was performed LC-DAD-IT and LC-DAD- TOF analyses were performed using an UFLC instrument (Shimadzu, Japan). LC-DAD-MS/MS

was acquired using the UFLC apparatus coupled with an Ion Trap Mass Spectrometer (amaZon SL, Billerica – USA).

Samples used in LC-DAD-IT and LC-DAD-TOF were submitted to high-resolution mass spectrometry analysis. Samples were introduced into the ESI source by syringe pump and analyzed by an ultrOTOFTQ (Bruker Daltonics, Billerica – USA) mass spectrometer. The putative identification of bioactive compound was assisted by molecular networking, i.e., clustering of MS/MS spectra by cosine similarity. Putative structures of some molecular species were proposed by MS/MS-based fragmentation patterns.

Results

Metagenomic sequencing and functional screening.

Metagenomic sequencing of 12 soil samples amended with organic compost through 5 years yielded total sequences count of 28 - 30 million per sample. Since, metagenomic can afford an initial picture of the physiological properties of microbial community in samples, we compared our results with the COG and SEED Subsystem databases link to MG-RAST metagenomics analysis server, in order to assess the prominent functions of major bacterial genera in samples. A highly recurrent trait in the functional screening of samples, it was the occurrence of significantly production of wide variety of secondary metabolites by bacterial species from Gammaproteobacteria class, which mainly belonging to *Pseudomonadacea* family.

Isolation and characterization of *Pseudomonas* bacteria

King's A and B modified media culture were used in order to recover bacteria belonging to *Pseudomonas* genus. A total of 37 isolates with distinct colony phenotype (Including fluorescent pigment production under UV light) were recovery from soil samples organic compost amendment. All of these isolates were screened *in vitro* for their ability to inhibit the growth of Xcc 306. Bacteria that displayed any antibacterial ability against Xcc 306 were identified by molecular, biochemistry and physiological methods.

Table 2. Antagonist *Pseudomonas* bacteria isolated from soil samples.

Isolate	Closest species type strain	GenBank accession no	16S rDNA Similarity (%)	Antagonist ability assay ^a
<i>Pseudomonas</i> sp. JS1	<i>Pseudomonas donghuensis</i> strain HYS	NR136501.1	99	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. JS2	<i>Pseudomonas entomophila</i> strain L48	NR102854.1	99	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. JS3	<i>Pseudomonas monteilii</i> strain CIP 104883	NR024910.1	99	+
<i>Pseudomonas</i> sp. JS4	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> strain L-1	NR025881.1	99	++
<i>Pseudomonas</i> sp. JS5	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> strain BCRC 17751	NR116172.1	99	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. JS6	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> strain IAM 1439	NR042435.1	98	++
<i>Pseudomonas</i> sp. JS7	<i>Pseudomonas mosselii</i> strain CFML 90-83	NR024924.1	99	++
<i>Pseudomonas</i> sp. JS8	<i>Pseudomonas putida</i> strain NBRC 14164	NR11365.1	98	+

^a Antagonist ability assay based on disk diffusion method. +, low; ++, medium; +++, high.

A total of 8 *Pseudomonas* species were characterized using API 20 NE test (bioMérieux), ability to growth at 42 °C and on 6%, 7%, 8 % NaCl and by sequencing of PCR- mediated 16S rRNA amplification products (Table 2). Because the highest 16s rRNA gene sequences similarity, among some isolated *Pseudomonas* species, additional assays were performed in order to stablish more accuracy characterization (Table 3).

MIC and MBC for *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306

All 37 isolated bacteria from soil samples were screened by agar diffusion technique for their ability to inhibit Xcc 306 growth, only 8 of them displayed any inhibition grade. According to Xcc 306 growth inhibition halo, bacterial strains were classified as: high antagonist, medium antagonist and low antagonist (Table 2). The antagonism assay performed using bacterial cells shown size inhibition zone in the range of 8 to 14 mm. Size inhibition zones in the antagonism assay performed using crude bioactive extract free of cells were 0.4 to 1.5 fold higher.

The MIC was defined as the lowest crude extract concentration at which Xcc 306 no growth at 36 hours of incubation, our findings shown MIC for all isolated that displayed antibacterial activity against Xcc 306 ranging between 25-100 μg (Fig. 1). The MBCs for *Pseudomonas* sp. JS1 was 25 μg , for *Pseudomonas* JS2, JS5 and JS7 were 50 μg , while for *Pseudomonas* sp. JS3, JS4 and JS8 were 100 μg .

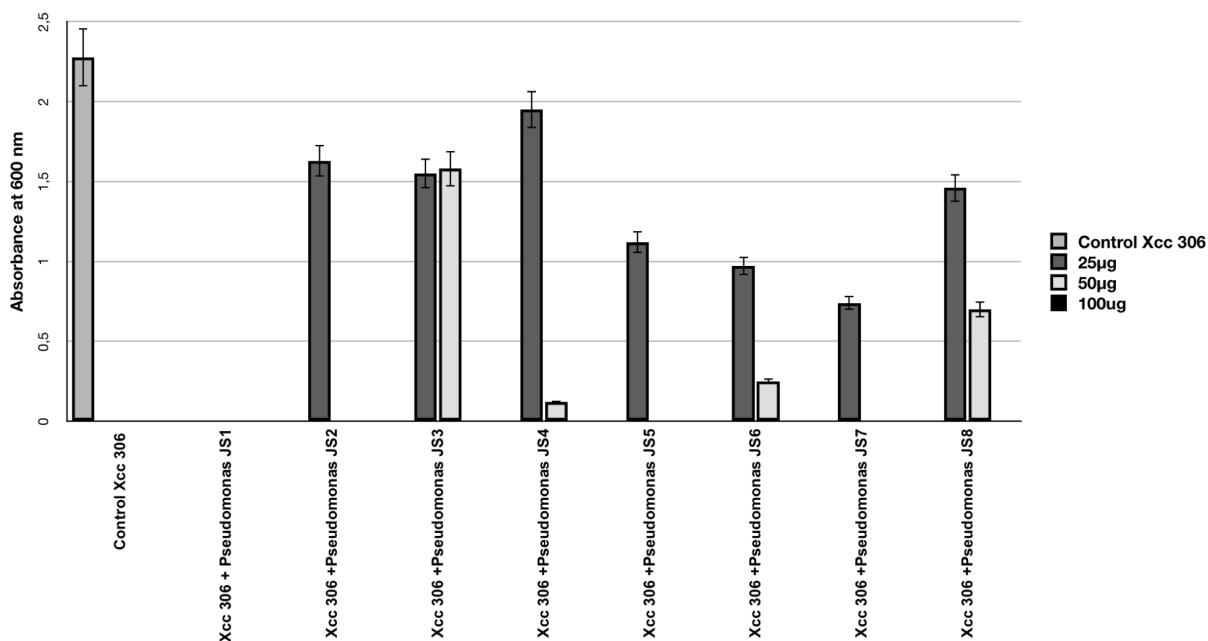


Figure 1. Antagonist *Pseudomonas* minimal inhibitory concentration over Xcc 306. Macrodilution method. Bars represent standard deviation of measurements. The assays were repeated three times in three independent experiments that yielded similar results. Only one representative result is presented in the figure.

***In planta* antibacterial activity against Xcc 306**

In order to verify the antibacterial effect of isolated *Pseudomonas* bacteria against Xcc 306 infecting a high susceptible host, as well to measure its outcome over citrus canker severity, *Citrus x limonia* leaves were infected with a mixture of each antagonist *Pseudomonas* and Xcc 306 at equal population density by infiltration pressure method, *Citrus x limonia* plants were grown under controlled conditions and citrus canker lesions were quantified at 21 DPI.

None of antagonist bacteria shown virulence against citrus host. Our results shown that only the antagonist *Pseudomonas* sp. JS2 displayed a clear citrus canker reducing effect (Fig. 2 and 3). This bacterium shares more than 99% of 16S rRNA gene sequence similarity with *Pseudomonas entomophila*, our results from biochemistry and physiological additional assays performed in order to stablish *P. entomophila* identification and discriminate to the closest type strains, suggest strongly the identification of *Pseudomonas* sp. JS2 as *Pseudomonas entomophila* (Table 3).

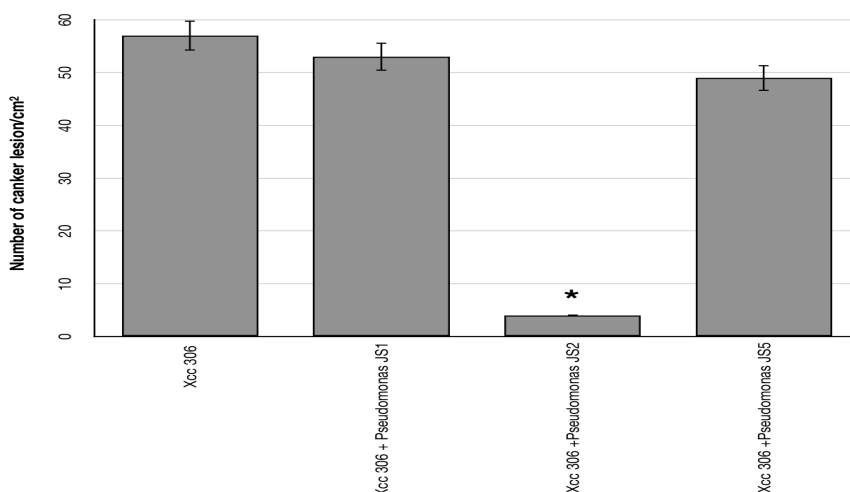


Figure 2. *Pseudomonas* antibacterial activity against Xcc 306. Quantification of canker lesions in *Citrus x limonia* leaves at 21 days post-inoculation. Leaves inoculated by pressure infiltration with a mixture of antagonist *Pseudomonas* bacteria and Xcc 306 (10^8 CFU mL⁻¹). Values given are the means and bars represent standard deviation of measurements. Values marked with an asterisk are significantly different from Xcc 306 alone (10^8 CFU mL⁻¹) at $P < 0.05$ using one-way ANOVA with post hoc test (Bonferroni) with SPSS STATISTICS DESKTOP software, v. 22.0.

Results of bacterial recovery assays from infected plants shown that only *Pseudomonas* sp. JS2 grown in king's B medium at 7 DPI. Interestingly *Pseudomonas* sp. JS1 that displayed a higher *in vitro* antibacterial activity against Xcc 306 was not recovered at 3 DPI.

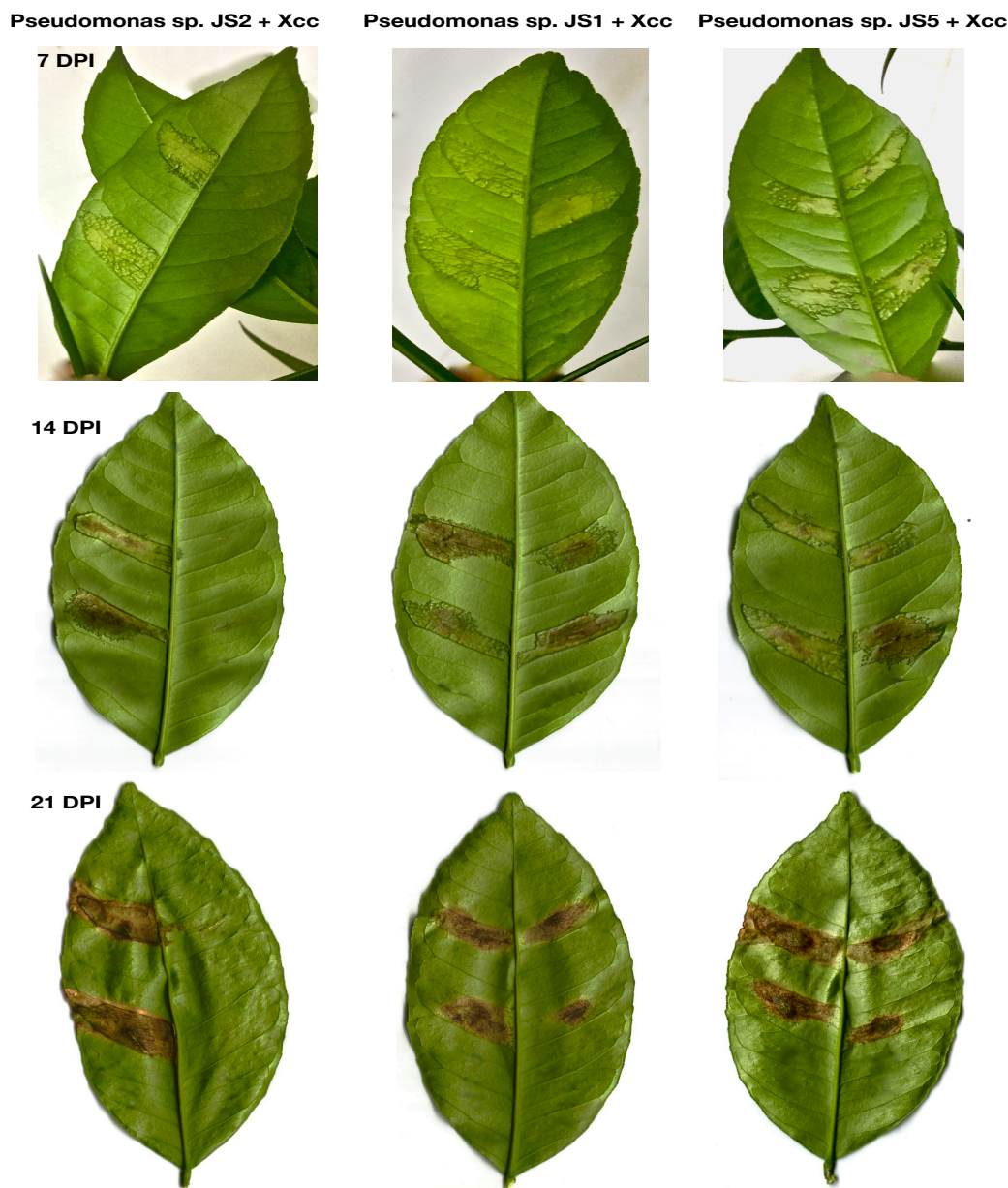


Figure 3. Effect of *Pseudomonas* isolated over citrus canker severity. *Citrus x limonia* leaves infected by infiltration pressure at 7, 14 and 21 DPI. Right side of leaf: antagonist *Pseudomonas* isolated plus Xcc 306. Left side of leaf: Xcc 306 (10^8 CFU mL⁻¹). Both bacteria were co-infiltrated at the identical concentration (10^8 CFU mL⁻¹). Bacterial strains were mixed just prior to infection. The assays were repeated three times with three plants each time, yielding similar results. Only one representative result is presented in the figure.

Identification of putative bioactive compound

In order to elucidate the chemical nature of putative bioactive compound responsible for antibacterial activity against Xcc 306, analysis of concentrated crude extract free of cells of each antagonist *Pseudomonas* strains were performed by LC-MS/MS spectral similarity and assisted by molecular networking (Wang M et al., 2016). Molecular network for 8 bacterial strains has revealed a clearly defined cluster of small cyclic peptides that could be partially responsible for the antibacterial ability, it which identified as members of diketopiperazine (DKPs) molecules family.

Discussion

In microbial world most of microbe face continuous confrontation by resource. Therefore, the potential bacterial competitors should be endowed with an enormous array of mechanisms responsible by the emergence and domination of particular bacterial populations.

Bacteria belonging to *Pseudomonas* genus have a highly variable genome size from 3.7 to 7.1 Mb, which contain more than 6390 predicted genes (Singh et al., 2016), which could explain their capacity to produce the massive arrangement of organic compounds varying from simple carbohydrates to complex biomolecules such as biosurfactants, insecticides, phytotoxic compounds, antibiotics and siderophores, which enabling them to compete in high diverse ecological niches.

Understanding of this sophisticated metabolic plasticity and its roles in the diverse environmental niches could afford valuable information regarding to improve growth promoting activities and biological control to phytopathogens in commercial crops. In this study by metagenomic and culture dependent approaches were isolated and characterized from soil samples of São Paulo Zoo Park farm, 8 bacterial strains belonging to *Pseudomonas* genus able to inhibit *in vitro* the Xcc 306 growth. Since, the totality of *Pseudomonas* species screened in their ability to inhibit *in vitro* the Xcc 306 growth, they were isolated from soil samples and aware of the hallmark metabolic plasticity of *Pseudomonas* genus, it is reasonable to think that successful fitness to a very different ecological niche i.e. mesophyll tissue in plant leaves, must not represent an enormous challenge for these bacteria.

Remarkably, only the strain *Pseudomonas* sp. JS2 identified as *P. entomophila* has been recovered from infected plants, moreover, *Pseudomonas* sp. JS2 was the most successful treatment reducing almost completely citrus canker symptoms in highest susceptible citrus hosts.

Dissimilar behavior was shown by *Pseudomonas* sp. JS1 identified as *Pseudomonas donghuensis* and *Pseudomonas* sp. JS5 identified as *Pseudomonas taiwanensis*, which despite to displayed *in vitro* a high inhibitory effect over Xcc 306 growth. These bacteria don't achieve significant reduction of citrus canker symptoms in susceptible host. Besides, *Pseudomonas* sp. JS1 and *Pseudomonas* sp. JS5 could not be recovered from Xcc 306 coinfecting tissues. These facts strongly suggest an incompatibility relationship between *Pseudomonas* sp. JS1 and *Pseudomonas* sp. JS5 and *Citrus x limonia* plants, it which evidencing the difficulty of these bacteria to fitness as successful endophytes in citrus leaves.

One possible explanation could be that *Pseudomonas* sp. JS1 and *Pseudomonas* sp. JS5 are devoid of T6SS (Type VI Secretion System), while *Pseudomonas* sp. JS2 have one gen cluster that encode components for T6SS device (Sarris and Scoulica 2011). Although that T6SS was initially identified in the pathogenic bacteria *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas aeruginosa* (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006), later it was described in non pathogenic bacteria (Marchi et al., 2013). Researches of T6SS in plant-microbe interaction established a role of this secretion system in endophytic lifestyle (Wu et al., 2008).

Additional possible explanation, for the refractory colonization of mesophyll tissue in citrus leaves by *Pseudomonas* sp. JS1 and *Pseudomonas* sp. JS5, could be that some of their structural components can act as PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) triggering immune response in citrus host, it which causing a failure in establishment and bacterial multiplication within the host, however, this remains speculative. It should be noted that based in 16S rRNA gene sequences, *Pseudomonas* sp. JS2 identified as *P. entomophila* is closely related to *P. monteilii* and *P. mosselii* species i.e. 99.7 and 99.8% similarity (Vodovar et al., 2005, Mulet et al., 2012), for this reason, additional physiological and biochemical characteristics were

tested by API 20NE, fluorescent pigment production and 42°C, 6%NaCl, 7% NaCl, 8%NaCl growth. Different test such as urease, gelatinase activity and others mention before aimed to evaluated phenotypic traits, which become in valuable tools that complement genotypic characterization, in order to get more discriminated classification at specie level, specially with *Pseudomonas* genus bacteria.

HPLC-Ion Trap-MS assays assisted by TOF-MS, MS/MS-based fragmentation and molecular net working unveiled the chemical nature of putative compound with antibacterial activity as cyclodipeptide knowing as diketopiperazines. DKPs are the smallest peptides identified, it which are produced by widespread gram negative bacteria (Sammes et al., 1975). Important biological activities attributed to DKPs comprising: antiviral (Sinha et al., 2004) antifungal, antibacterial (Uhegbu et al., 2005), antiprion (Bolognesi et al., 2010) and bacterial quorum quenchers (Lee eta al.,2010). DKPs are biosynthesized by dedicated nonribosomal peptide synthetases (NRPSs), however an alternative route that employs also NRPSs, synthetizes them as truncated side products during the synthesis of longer peptides, it which has been documented in *E. coli* (Gruenewald et al., 2004). DKPs produced by *Pseudomonas* bacteria are cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Phe-L-Pro), cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(L-Leu-L-VaL) (Holden et al., 1999).

DKPs are recognized antagonist of N-AHL-dependent quorum sensing. Since quorum sensing in Xcc 306 is mediated by molecule *cis*-11-methyl-2-dodecenoic acid belonging to DSF autoinducer family (Tang et al.,1991). It is difficult that reduction of citrus canker severity was due to perturbation of cell-cell communication system by DKPs. Recently was documented disruption of DSF quorum sensing in Xcc 306 by *Pseudomonas* bacteria, using a mechanism different than DKPs, which was based on modification of DSF molecule via addition of sugar moiety by UDP-sugar transferase enzymes (Caicedo et al., 2016). *P. entomophila* harbors five NRPS gene clusters coding for NRPSs, which are responsible for synthetize at least three different lipopeptides and a polyketide of unknown function (Vodovar et al. 2006).

This allow us to suggest that Xcc 306 growth inhibition by *Pseudomonas* sp. JS2 is not exclusively by DKPs action, instead a collective action of T6SS,

DKPs and NPRSs product, could be necessary for the successful biological control of citrus canker disease. Besides, due to entomopathogenic ability of *P. entomophila*, this bacterium could be a promissory biocontrol agent in vector borne diseases as variegated chlorosis and citrus greening, which are serious threat to citrus crops.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to Professor Michael Chandler from CNRS, Laboratoire de Microbiologie et Genetique Moleculaires, Universite Toulouse, France for his critical reading and valuable suggestions, to the Centro de Recursos Biologicos e Biologia Genomica CREBIO, Univ. Estadual Paulista, Jaboticabal SP, Brazil for the DNA sequencing. Villamizar S, was the beneficiary of PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

This research was supported by funding from the *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP* (Foundation of Research Support of the São Paulo State - FAPESP) (Project number: 2013/08729-0).

Literature Cited

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45: 493–496.

Bolognesi, M.L., Ai Tran, H. N., Staderini, M., Monaco A., López-Cobeñas, A., Bongarzone, S., Biarnés, X., López-Alvarado P., Cabezas, N., Caramelli, M., Carloni, P., Menéndez, J. C., Legname, G. 2010. Discovery of a class of diketopiperazines as antiprion compounds. *ChemMedChem.* 5: 1324-1334.

Djavaheeri, M., Mercado-Blanco, J., Versluis C., Meyer, J.M., Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. 2012. Iron-regulated metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens* WCS374r are not required for eliciting induced systemic resistance (ISR) against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis*. *Microbiology Open.* 1:311–25

De Vleeschauwer, D., Djavaheeri, M., Bakker P.A.H.M., Höfte, M. 2008. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiol.* 148:1996–2012

- Gross, H. & Loper, J.E. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep.* 26: 1408–1446
- Gu, Y. H., and Mazzola, M. 2001. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8. *Soil Biol. Biochem.* 33:1155-1162
- Gruenewald, S., Mootz, H. D., Stehmeier, P., Stachelhaus, T. 2004. *In vivo* production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3282-3291.
- Hökeberg, M., Gerhardson, B., Johnsson, L. 1997. Biological control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse selected bacteria. *Eur J Plant Pathol.* 103:25–33.
- Holden, M.T.G., Chhabra, S.R., de Nys, R., Stead P., Bainton, N.J., Hill, P.J., Manefeld, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B., Bycroft, B.W., Kjelleberg, S., Williams, P. 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 33: 1254-1266.
- Kamala-Kannan, S., Lee, K.J., Park, S.M., Chae J.C., Yun B.S., Lee, Y.H., Park, Y.J., Oh, B.T. 2010. Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J Basic Microbiol.* 50:200–205
- Kevin, R. Foster and Thomas. 2012. Bell Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species. *Current Biology.* 22: 1845–1850.
- Lee, K.H., Kim G.W., Rhee, K.H. 2010. Identification of *Streptomyces* sp. KH29, which produces an antibiotic substance possessing an inhibitory activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1672-1676.
- Marchi, M., Boutin, M., Gazengel, K., Rispe, C., Gauthier, J.P.P., Guillerme-Erckelboudt, A.Y.Y. et al. 2013. Genomic analysis of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp with evidence of T3SS and T6SS gene expression on plant roots. *Environ Microbiol Rep.* 5: 393–403
- Mercado-Blanco, J., Bakker, P.A.H.M. 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 92:367–389
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza M., Olson, R. , Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., and Edwards R.A. 2008. *BMC Bioinformatics.* 9:386

Mulet, M., Gomila, M., Lemaitre, B., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E. 2012. Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 35:145–149

Partap, B.S., Harvinder, S.S., and Rachhpal, S. K. 2016. *Pseudomonas*: The Versatile and Adaptive Metabolic Network. 81-126 in *Pseudomonas*: Molecular and Applied Biology, Kahlon. Springer International Publishing Switzerland 81 R.S.

Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J.-M., Défago, G., et al. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst Appl Microbiol.* 34: 180–188.

Raaijmakers, J.M., Mazzola, M. 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 50: 403–424.

Sammes, P. G., 1975. Naturally occurring 2,5-dioxopiperazines and related compounds. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 32: 51-118.

Sarris, P.F., Scoulica, E.V. 2011. *Pseudomonas entomophila* and *Pseudomonas mendocina*: potential models for studying the bacterial type VI secretion system. *Infect, Genet Evol.* 11:1352–1360

da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C. et al., 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature.* 417: 459–63

Sinha, S., Srivastava, R., De Clercq, E., Singh, R. K. 2004. Synthesis and antiviral properties of arabino and ribonucleosides of 1,3-dideazaadenine, 4-nitro-1,3-dideazaadenine and diketopiperazine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 23: 1815-1824.

Tang, J.L., Liu Y.N., Barber, C.E., Dow, J.M., Wootton, J.C., Daniels, M.J. 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris pathovar campestris*. *Molecular and General Genetics.* 226: 409–17.

Uhegbu, E. E., Trischman, J. A. 2005. Abstracts of Papers, 229th National Meeting of the American Chemical Society, San Diego, CA. American Chemical Society: Washington, DC. CHED 1151

Vlassak, K., Holm L., Duchateau, L., Vanderleyden, J., Mot R. 1992. Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana grown in Sri Lanka. *Plant Soil.* 145: 51–63.

- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., Lemaitre, B. 2005. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* .102:11414–11419
- Vorholt, J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Rev Microbiol* 10: 828–840
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapon, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik A.V., Meehan M.J., Liu W.T., et al. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol.* 34(8):828–837.
- Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., De La Fuente, L., Blouin Bankhead, S., Molar, R.A., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. 2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biol.* 9:4–20
- Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., Van der Lelie, D. 2010. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev.* 35:299–323
- Wu, H.Y., Chung, P.C., Shih, H.W., Wen, S.R., Lai, E.M. 2008. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 190:2841-2850.
- Yergeau, E., Sanschagrin, S., Beaumier, D, Greer, C.W. 2012. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. *PloS One.* 7:e30058