

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

**ACESSANDO O MICROBIOMA DA RIZOSFERA DA
CANA-DE-AÇÚCAR EM CULTIVO ORGÂNICO COMPARADO
AO CONVENCIONAL**

Maria Fernanda Zaneli Campanari
Biotecnologista

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

**ACESSANDO O MICROBIOMA DA RIZOSFERA DA
CANA-DE-AÇÚCAR EM CULTIVO ORGÂNICO COMPARADO
AO CONVENCIONAL**

Maria Fernanda Zaneli Campanari

Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária

C186a	Campanari, Maria Fernanda Zaneli Acessando o microbioma da rizosfera da cana-de-açúcar em cultivo orgânico comparado ao convencional / Maria Fernanda Zaneli Campanari. -- Jaboticabal, 2019 81 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Daniel Guariz Pinheiro Coorientador: Marcos Antônio Soares 1. Metagenômica. 2. Rizosfera. 3. Cana-de-açúcar. 4. Ecologia microbiana. 5. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ACESSANDO O MICROBIOMA DA RIZOSFERA DA CANA-DE-AÇÚCAR EM CULTIVO ORGÂNICO COMPARADO AO CONVENCIONAL

AUTORA: MARIA FERNANDA ZANELI CAMPANARI

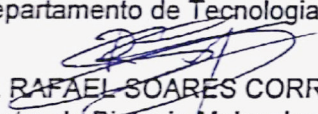
ORIENTADOR: DANIEL GUARIZ PINHEIRO

COORIENTADOR: MARCOS ANTÔNIO SOARES

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

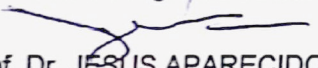


Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Dr. RAFAEL SOARES CORREA DE SOUZA

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética-CBMEG / Campinas/SP



Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO

Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 26 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nasceu no dia 07 de Julho de 1994, em Osvaldo Cruz, São Paulo, Brasil. Filha de Vanda Zaneli Campanari e Clovis Campanari. Graduiu-se em Biotecnologia, em junho de 2017, pela Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD Dourados/ Mato Grosso do Sul. Ingressou no começo de agosto de 2017 no Curso de Mestrado, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, que resultou no presente trabalho.

"A distância é curta quando se tem um bom motivo"
- *Orgulho e Preconceito, Jane Austen*

*Dedico este trabalho a minha família, Clóvis, Vanda e Bruno e ao meu noivo Rafael
que sempre me apoiaram. Me dando força, palavras doces e abraços, não faltando em
momento nenhum.
Obrigada por tudo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, por me permitir chegar até aqui e concluir mais uma fase da minha vida. E à minha família, que sempre foi o meu maior suporte e que mesmo longe nunca me faltaram.

À meu orientador Daniel Guariz Pinheiro e ao meu Coorientador Marcos Antônio Soares os quais me proveram a determinação para desenvolvimento deste e dos outros trabalhos que realizamos, através de sua paciência infinita e imenso conhecimento, características dos verdadeiros mestres, que levarei para sempre.

Ao meu companheiro e parceiro de trabalho Rafael Correia da Silva, por estar em todos os momentos ao meu lado, nos bons e maus momentos. Por sua paciência gigante e por tudo que sempre fez por mim, me dando carinho, tranquilidade e calma. Sempre me ajudando a compreender e ver melhor as coisas, e claro resistindo e levando a vida com um humor singular.

Agradeço também aos membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioinformática (LB) e do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), que me acolheram e me ajudaram em diversos momentos, em especial Luis Guillermo, Michelli, André, Lucas, Michelle e Ana Carolina.

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

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. nº. 20179008-5), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas aos alunos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho. Agradecemos ao Programa de Microbiologia Agropecuária pelo suporte acadêmico.

Agradecimentos especiais ao Paulo Eduardo Garcia e Eduardo Garcia, proprietários da Fazenda São José, e, ao André Garcia Neto e à Olivia Garcia, proprietários da Fazenda São Sebastião, os quais concederam acesso às fazendas e permitiram a coleta de amostras de cana-de-açúcar orgânica e convencional.

Agradeço a todos imensamente.

SUMÁRIO

	Página
1 Introdução	1
2 Objetivos Gerais	5
2.1 Objetivos Específicos	5
3 Revisão de literatura	7
3.1 A importância da Cana-de-açúcar	7
3.2 Agricultura Orgânica em resposta a Convencional	8
3.3 Agricultura Orgânica	9
3.4 Legislação sobre Agricultura Orgânica	10
3.5 Microbioma e a Rizosfera	11
3.6 Bioinformática	15
3.7 Metagenômica - estado da arte.	18
4 Materiais e Métodos	23
4.1 Descrição do local e amostragem	23
4.2 Especificações sobre os manejos dos talhões convencional e orgânico	27
4.3 Parâmetros físico-químicos e composicionais do solo	28
4.4 Extração de DNA total e sequenciamento	30
4.5 Montagem do metagenoma referência	30
4.6 Predição e anotação funcional de proteínas	32
4.7 Predição taxonômica e análises de diversidade	32
4.8 Comparação aos microbiomas de cana-de-açúcar públicos	33
4.9 Estimativa dos genes diferencialmente abundantes entre os manejos	34
4.10 Análise dos termos associados aos genes diferencialmente abundantes	34
5 Resultados e discussão	37
5.1 Descritivos numéricos de montagem e anotação	37
5.2 Métricas: montagem e anotações (taxonômica e funcional).	37
5.3 Abundância funcional KEGG e GO	38
5.4 Prospecção de genes relacionados à promoção de crescimento e degradação de xenobióticos.	40
5.5 Abundância de genes de resistência a antibióticos (Resistoma)	44
5.6 Diversidade microbiana entre manejos - análise taxonômica.	45
5.7 Prospecção de táxons e diversidade comum entre microbiomas de cana-de-açúcar.	53

6	Conclusões	55
7	Referências bibliográficas	57
7.1	Referências	57

ACESSANDO O MICROBIOMA DA RIZOSFERA DA CANA-DE-AÇÚCAR EM CULTIVO ORGÂNICO COMPARADO AO CONVENCIONAL

RESUMO – O cultivo intensivo agrícola, apesar de altamente produtivo, possui diversos pontos questionáveis, como suplementação acentuada de insumos sintéticos, além da aplicação de defensivos para o controle de pragas que muitas vezes são danosos ao meio ambiente. Como alternativa, a agricultura orgânica propõe uma forma de manejo menos agressiva, que promove o uso sustentável dos recursos naturais renováveis, como o aproveitamento de resíduos orgânicos, além de possuir um maior valor agregado no produto final. No presente estudo, investigamos por meio de uma abordagem metagenômica os efeitos do manejo (orgânico ou convencional) na microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar, região da planta que notoriamente causa um grande impacto no seu desenvolvimento e produtividade. Identificamos a abundância maior na rizosfera com manejo orgânico de porções genômicas que codificam enzimas associadas ao metabolismo do nitrogênio e enxofre, sendo que estes são nutrientes fundamentais para o sucesso da planta e assim, seu desenvolvimento e produtividade em campo. Contraditoriamente, encontramos também que os genomas da microbiota orgânica possuem conteúdo ligado a um potencial mais acentuado para a degradação de compostos xenobióticos, que são ativamente aplicados no manejo convencional. De acordo com nossa predição, os microrganismos dessa microbiota poderiam realizar sua completa mineralização, o que é muito favorável na remoção desses resíduos no ambiente. Esses achados indicam que há um potencial único para exploração do cultivo orgânico, além da capacidade de fornecer alimentos livres de agroquímicos por meio de um manejo que propende causar um menor impacto ao ambiente agroecológico. Consideramos, com base nos resultados, que esse ambiente pode ser uma fonte de bioprospecção de microrganismos associados aos ciclos de nutrientes, como N e S, além de potenciais degradadores de xenobióticos para biorremediação.

Palavras-chave: Metagenômica total, microbioma associado a plantas, rizobactérias promotoras de crescimento em plantas

ACCESSING THE SUGARCANE RHIZOSPHERE MICROBIOME UNDER ORGANIC CULTIVATION CONTRASTING A CONVENTIONAL SYSTEM

ABSTRACT – Modern industrialized agriculture although highly productive, has several sustainability problems such as the for intense supplementation of synthetic inputs, beyond the application of pesticides for pest control. Which are often harmful to environment. As an alternative to this system, organic agriculture is considered more environmentally progressive, having several characteristics favorable to the crop producer, promotes sustainable use of renewable natural resources, such as the use of organic waste, besides that a higher aggregated value in the final product. This study investigates the changes that an organic system brings when compared to conventional management for the sugarcane rhizosphere microbiome, a plant region known to be determinant of plant development and associated with net productivity, using a metagenomic approach. We identified a higher abundance of genomic portions which encode enzymes associated with nitrogen and sulphur metabolism, which are fundamental nutrients for plant success and subsequently, crop productivity. Conversely, we also found that genomes of the organic microbiome contain higher portions linked to xenobiotic degradation, compounds that are actively applied in conventional management. Microorganisms from this sequenced microbiome could perform complete mineralization of these damaging compounds, which is desirable in their removal from the environment. These findings indicate that there is a unique potential for exploitation of organic farming, in addition to the ability to provide agrochemical-free through management that tends to have a lower impact on the agroecological environment. Based on the results, the organic system environment may be a source of microorganisms associated with nutrient cycles - nitrogen and sulphur, as well as microbes associated with bioremediation through xenobiotics degradation.

Keywords: Whole-metagenome shotgun, plant-associated microbiome, plant growth promoting rhizobacteria

LISTA DE TABELAS

Página

4.1	Localização geográfica dos pontos de amostragem, data da coleta e dados ambientais.	27
4.2	Dados climatológicos no período de cultivo.	27
4.4	Insumos agrícolas utilizados na cultura orgânica de cana-de-açúcar.	28
4.5	Insumos agrícolas utilizados na cultura convencional de cana-de-açúcar.	29
5.1	Leituras de sequenciamento e métricas de anotação taxonômica.	37
5.2	Métricas de montagem e quantitativos de anotação do metagenoma.	38
5.3	Taxonomia atribuída aos elementos de resistoma.	46
5.4	Índices de alfa-diversidade e testes de média entre tratamentos.	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
3.1 Vantagens associadas aos sistemas de cultivo.	10
3.2 Desenvolvimento histórico da metagenômica no contexto da ecologia microbiana. (Maron et al., 2007)	16
4.1 Mapeamento em sistema de posicionamento global (GPS) da amostragem.	24
4.2 Fotografia do esquema de coletas	26
4.3 Parâmetros físico-químicos dos solos.	31
4.4 Diagrama das análises de bioinformática.	35
5.1 Visão geral de rotas metabólicas prevalentes entre manejos (KEGG)	39
5.2 Funções moleculares (GO) em porções genômicas diferencialmente abundantes.	40
5.3 Metabolismo potencial diferencial de nitrogênio (KEGG)	41
5.4 Metabolismo potencial diferencial de tolueno e benzoato (KEGG)	43
5.5 Metabolismo potencial diferencial de enxofre (KEGG)	44
5.6 Classes de elementos de resistência a antibióticos diferencialmente abundantes entre os manejos.	46
5.7 Distribuição das bactérias a nível de filo e gênero.	48
5.8 Comparação das comunidades microbianas pela diversidade β	49
5.9 Abundância diferencial de gêneros microbianos	51

Introdução

O cultivo competitivo da cana-de-açúcar exige volumes consideráveis de defensivos agrícolas, ocasionando perda e fragmentação de habitats, declínio da biodiversidade, impacto na resiliência da microbiota edáfica, maior incidência de doenças ocasionadas por fitopatógenos e, por consequência final, aumento gradativo dos custos de produção (Muller et al., 2017; Li et al., 2012; Jeschke, 2016; Sánchez-Bayo, Tennekes, 2017). Nesse contexto, a produtividade pode ficar comprometida, através da exaustão dos recursos do solo, hídricos e genéticos (Gliessman, 2006b). Além disso, devido as quedas cada vez mais drásticas no rendimento e produtividade, existe uma pressão pela busca de insumos cada vez mais potentes e potencialmente mais danosos (Lin et al., 2013).

A agricultura orgânica tem se colocado como uma alternativa sustentável, contrapondo o cultivo convencional (aqui definido como aquele em que há aplicação de defensivos agrícolas). No manejo orgânico, há redução ou eliminação completa do uso de insumos sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, com ênfase à otimização da produtividade enquanto busca minimizar os impactos ambientais (Duarte et al., 2017). Ainda, ocorre uma redução direta em termos de poluição dos ambientes atmosféricos, aquáticos e edáficos, o que se considera uma contribuição positiva para o equilíbrio dinâmico nas comunidades da flora e fauna, incluindo o bem-estar humano (Lori et al., 2017; Xia et al., 2015). Além disso, esse sistema encoraja o uso de recursos regionais e aproveitamento de matéria orgânica (vegetal e/ou animal), e assim procura garantir a produtividade do solo, nutrição apropriada para a planta e controle de pragas de maneira tão efetiva quanto o manejo convencional (Rodrigues et al., 2018).

A microbiota desempenha papéis fundamentais no desenvolvimento e produtividade das plantas por mecanismos diretos e indiretos, especialmente em associação simbiótica (Turner, James, Poole, 2013; Lugtenberg, Leveau, 2007). Atenção especial recebe a rizosfera, ambiente edáfico que sofre influência do sistema radicular, que sofre intensa colonização e atividade da microbiota constituída por diferentes grupos de microrganismos (Bakker et al., 2013a).

A riqueza e estrutura dessa comunidade é fortemente influenciada por compostos

orgânicos exsudados pelas raízes, estimulando a atividade e a funcionalidade dos microrganismos associados, o que resulta em altas densidades microbianas, cerca de 10^{11} células de microrganismo e 10^{12} genes funcionais em cada grama de solo rizosférico (Egamberdieva et al., 2008; Trevors, 2010).

Além disso, devido a alta circulação de compostos nutritivos nesse microambiente, alguns dos microrganismos ali presentes atuam direta ou indiretamente na promoção do crescimento vegetal, como as rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs), que são conhecidas por sua atuação direta em benefício da planta (Bruto et al., 2014), e são por vezes selecionados pela própria planta para ali habitarem, através de comunicação química.

Não bastando, as espécies microbianas na rizosfera atuam diretamente na ciclagem de nutrientes disponível para a planta, realizando o aproveitamento e biodisponibilização de diferentes substratos orgânicos e inorgânicos inassimiláveis diretamente, mas essenciais para a nutrição vegetal.

Esses microrganismos também realizam diversas outras funções interessantes, como a síntese e secreção de fitormônios, melhoria da estrutura física do solo; ou ainda indiretamente colaboram com o crescimento e produtividade vegetal, indução de respostas de defesa no hospedeiro contra fatores bióticos ou estresses abióticos, como, fitopatógeno, salinidade, presença de metais pesados e altas temperaturas (Yang, Kloepper, Ryu, 2009; Bakker et al., 2013b).

As Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCPs) recebem maior destaque na literatura, pois implicam em uma maior disponibilidade de nutrientes como o nitrogênio através do mecanismo de nodulação. Além disso levam ao estímulo das raízes através da produção de fitormônios e outras moléculas-sinais, estão correlacionadas com a síntese de etileno da planta. Indução da resistência sistêmica na planta (Bruto et al., 2014; Lugtenberg, Kamilova, 2009; Berg et al., 2017).

As microbiotas rizosférica e edáfica desempenham, por fim, outros serviços ecossistêmicos como a biorremediação de contaminantes ambientais, especificamente xenobióticos que muitas vezes se mostram persistentes e altamente tóxicos (Bharadwaj, 2018).

O impacto do manejo convencional em comparação ao orgânico na microbiota rizosférica é pouco conhecido. Já existem documentadas algumas evidências que apontam para alguns benefícios do manejo orgânico, como aumento da diversidade e riqueza de bactérias (Lupatini et al., 2017; Hartmann et al., 2015) e também maior abundância de micorrizas (Aparna et al., 2014), sendo que esse efeito nas plantas é atribuído majoritariamente ao tipo de fertilização usada, comumente esterco.

Em busca de explorar a microbiota da cana-de-açúcar e tentar compreender como

os microrganismos atuam no desenvolvimento das plantas, Souza et al. (2016) verificaram e propuseram um conjunto de microrganismos fundamentais para a cana-de-açúcar utilizando da metataxonômica (aqui definido com análise de com marcador 16s), inclusive para a região da rizosfera, e observaram a alteração da estrutura das comunidades de microrganismos em associação aos diferentes compartimentos da planta, tanto endofíticos, como exofíticos, revelando que os microrganismos adquiridos pela rizosfera acompanham a planta durante todo seu crescimento, sendo o solo o reservatório primário da diversidade microbiana.

Apesar do conhecimento dos microrganismos presentes na microbiota da cana-de-açúcar, não há relato do impacto causado pelo tipo de manejo sobre a função da microbiota da rizosfera associada na cultura de cana-de-açúcar (Orr et al., 2015). O acesso aos participantes dessa comunidade, bem como à sua potencial atividade, são muito limitados pelos métodos dependentes de cultivo (Streit, Schmitz, 2004; Daniel, 2005). Diferentemente, métodos independentes de cultivo tem permitido acessar em profundidade os atributos como riqueza, abundância e diversidade da microbiota, bem como sua funcionalidade (Nesme et al., 2016; Martin et al., 2006).

A análise metagenômica baseada em DNA vem sendo utilizada para responder questões como a estrutura e função da microbiota num determinado ambiente, com ênfase em prover informações, promover soluções biotecnológicas agropecuárias, ambientais, e ainda realizar prospecções de biomoléculas, como Alvarez et al. (2013), que obteve enzimas celulolíticas do solo de cultivo de cana-de-açúcar e também no caso de Colombo et al. (2016) que também realizou a bioprospecção de genes que codificam enzimas lignocelulóticas a partir de um consórcio de microrganismos obtidos da mistura do bagaço da cana-de-açúcar e estrume de vaca.

Em cana-de-açúcar, até a data do presente trabalho, não existe ainda investigação sobre o potencial funcional da microbiota diferenciada pelas formas de manejo orgânico e convencional.

Na maioria das vezes, essas microbiotas foram exploradas por técnicas embasadas em cultivo, que acabam por restringir a análise de diversidade do solo devido ao fato de que a maioria desses microrganismos não são cultiváveis, ou ainda por sequenciamento de região marcadora, como a 16S do RNA ribossomal (Hamonts et al., 2018b; Braga et al., 2016; Lopes, Silva, Andreote, 2016; Souza et al., 2016).

Nesse contexto, nossa hipótese é que a estrutura e potencial gênico funcional da comunidade rizosférica associada à cana-de-açúcar são influenciados de acordo com os dois modos de cultivo considerados. Portanto, este trabalho pretende responder as seguintes perguntas:

1. O potencial funcional dos genes preditos no metagenoma da rizosfera de cana-

de-açúcar é influenciado pelo modo de cultivo?

2. A composição e a estrutura da comunidade se altera entre os diferentes manejos (orgânico e convencional)? Principalmente considerando o uso de insumos sintéticos no manejo convencional.
3. O manejo orgânico é a alternativa mais sustentável para a microbiota considerando o potencial metagenômico analisado?

Assim, este estudo tem a intenção de investigar o impacto do manejo na microbiota que habita a rizosfera de cana-de-açúcar.

Objetivos Gerais

Caracterizar a comunidade microbiana por sua diversidade (taxonomia e ecologia) e funcionalidade (ocorrência de genes) presentes na rizosfera da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), comparando o impacto do modo de cultivo (orgânico e convencional) da cana-de-açúcar, empregando uma abordagem independente de cultivo embasada no sequenciamento de DNA de alto rendimento.

2.1 Objetivos Específicos

1. Coletar as amostras de solos e região da rizosfera de forma representativa em duas áreas de cultura de cana-de-açúcar contrastantes com relação ao modo de cultivo (orgânico e convencional);
2. Extrair o material genético (DNA) do solo rizosférico, e então realizar o sequenciamento desse material utilizando tecnologia NGS;
3. Determinar parâmetros físicos e químicos dos solos a fim de relacioná-los com os resultados das análises metagenômicas;
4. Utilizar análises de bioinformática a fim de determinar as relações ecológicas nos ambientes, isto é, identificar os principais microrganismos presentes; seu papel, diversidade, e estrutura da comunidade; além de aferir as diferenças correspondentes aos tratamentos (convencional e orgânico), compreendendo os impactos na complexa relação entre o microbioma e os organismos;
5. A partir dos resultados da análise das comunidades microbianas, apontar possíveis aplicações pontuais dos microrganismos que potencialmente podem ser prospectados.

Revisão de literatura

3.1 A importância da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), *commodity* que acompanha nosso país desde sua fase colonial, trouxe para a contemporaneidade a oportunidade ao Brasil de estabelecer um modelo de matriz bioenergética na economia mundial, graças ao seus principais atributos compatíveis com a cultura de produção local: alta produtividade, excelente adaptação ao calor, capacidade de processamento local em produtos de alto valor agregado como açúcar, etanol e melaço, todos passíveis ao armazenamento, transporte e de intensa circulação dentro do país ou para exportações, além da produção de energia a partir do bagaço.

Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar bruta, chegando aos 625 mil toneladas na safra de 18/2019, na frente de países como Índia, China, Tailândia e Paquistão. É também o primeiro do mundo na produção e exportação de açúcar e o segundo maior produtor e exportador de etanol (BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento, 2018).

De acordo com o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES/CGEE, 2008), a indústria sucroalcooleira ainda se destaca pela autonomia energética do sistema de processamento - as usinas utilizam um sistema de cogeração de energia baseado na combustão do bagaço nas caldeiras. Este material fibroso pode chegar a até 70% da planta, que é reaproveitado, intensificando o rendimento do processo. Além disso, é cada vez mais notável a valorização deste excedente de bioeletricidade, com a possibilidade de sua comercialização.

Com a expansão da produção de etanol, com o intuito de suprir os mercados interno e externo paulatinamente mais demandantes, também aumentaram as preocupações relativas aos impactos dessa cultura - especialmente no estado de São Paulo, que abriga mais de 60% de produção brasileira (BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento, 2018).

Devido a essa mudança de paradigma de responsabilidade em relação ao meio ambiente, a via de cultivo orgânico tem ganhado destaque, pois por vezes alcançam

resultados semelhantes aos da agricultura convencional, porém tomando medidas mais conscientes com o ambiente e produção (Connor, 2018), como veremos a seguir.

3.2 Agricultura Orgânica em resposta a Convencional

O cultivo convencional da cana-de-açúcar utiliza de um número e volume intenso de insumos, especialmente defensivos agrícolas, que por vezes não são considerados os mais interessantes para a sustentabilidade do modelo produtivo, cujo interesse é a manutenção da alta produtividade enquanto se minimizam os impactos indesejados.

A agricultura contemporânea é norteadada por um conjunto de princípios participantes de uma filosofia nomeada de agricultura industrial, que se refere a práticas de utilização intensa do solo, a ênfase em monocultura, aplicação de fertilizantes sintéticos, irrigação e manejo químico de patógenos e pragas biológicas e a manipulação genômica de plantas e animais. Quando em desequilíbrio, tais práticas comprometem a produtividade futura, exaurindo os recursos edáficos, hídricos e genéticos (Gliessman, 2006a).

Uma alternativa aos processos da agricultura industrial é a agricultura orgânica, que no Brasil visa atender a Lei 10.831/2003, cuja filosofia norteadora é a otimização máxima dos recursos naturais e socioeconômicos, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica (Brasil, 2003).

Neste sistema agrícola, não se utilizam insumos sintéticos ou inorgânicos, tampouco organismos geneticamente modificados. No sistema orgânico, a ênfase é dada à otimização da produtividade, enquanto tenta alcançar a redução da poluição dos recursos - como água, ar e solo, e mantendo a saúde da comunidade de plantas, animais e pessoas.

Decorrencia disto é que as práticas orgânicas só são aceitas se todas estas condições são sistematicamente atendidas pelo produtor, e incluem práticas como rotação de culturas, fixação de nitrogênio por plantas leguminosas e biofertilizantes, utilização eficiente de rejeitos e esterco, sistema de manejo do tipo integração lavoura-pecuária e manejo integrado de pragas por controle biológico (Nandwani, Nwosisi, 2016).

Os conhecimentos sobre os biofertilizantes oriundos da agricultura orgânica podem ser impactantes se aplicados à agricultura convencional, pois apesar de se conhecerem os pormenores físico-químicos da fertilização orgânica Champagne et al. (2007), não estão esclarecidos ainda os impactos do manejo orgânico sobre o microbioma da planta - isto é, sobre os microrganismos que a cercam.

Por exemplo, em estudo com árvores de acerola sob o manejo orgânico, foi observada uma intensificação na atividade microbiana e no conteúdo de carbono no solo resultantes do manejo, sendo que essas alterações no solo são diretamente re-

lacionadas a sua estrutura e atividade biológica da planta, e, por consequência, na produtividade do processo, pois existem diferentes inter-relações entre os atributos físicos, químicos e biológicos no solo, que são responsáveis por diversos processos. Nesse caso, foi observado um benefício para o sistema agrícola (Sampaio, Araújo, Santos, 2008).

Já em cana-de-açúcar, é documentado um ganho em produtividade quando é aplicado um método orgânico de fertilização, o de vermicompostagem, notando também que a cana-de-açúcar responde bem aos manejos orgânicos, com resultados economicamente interessantes em produtividade e balanço de nitrogênio nos ditos manejos (Singh et al., 2007).

3.3 Agricultura Orgânica

Nos últimos anos, tem ocorrido uma demanda crescente por produtos saudáveis e sustentáveis, ou seja, isentos de contaminantes que possam agredir o meio ambiente ou a saúde dos seres humanos (Kearney, 2010).

Podemos considerar essa expansão, se observarmos os dados do Instituto de Pesquisa de Agricultura Orgânica (*Forschungs institut für biologischen Landbau* - FiBL) e a Federação Internacional dos Movimentos da Agricultura Orgânica (*International Federation of Organic Agriculture Movements* - IFOAM), em 2016 o cultivo orgânico ocupava uma área de 57,8 milhões de hectares (7,5 milhões a mais em comparação com 2015); no Brasil a área é de 750 mil hectares. Nesse mesmo ano (2015), o mercado mundial de produtos orgânicos movimentou USD 81,6 bilhões (Willer, Lernoud, 2016; Willer et al., 2018).

Os princípios da agricultura orgânica têm origem nas observações de Sir Albert Howard sobre os métodos praticados por agricultores indianos no começo do século XX. A partir dessas observações, Howard propôs uma abordagem holística para a agricultura, ressaltando a necessidade de uma compreensão integrada dos ciclos biogeoquímicos e dos processos biológicos para direcionar o manejo adequado considerando a inter-relação entre os fatores envolvidos. Nesse sentido, ele destaca o papel essencial do húmus para a fertilidade do solo e nutrição da planta (Howard, CIE, 1943).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) e a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO); A agricultura orgânica é um sistema abrangente, que procura por uma produção que promove a melhora da saúde do agroecossistema, incluindo biodiversidade, ciclos biológicos, e a atividade biológica do solo.

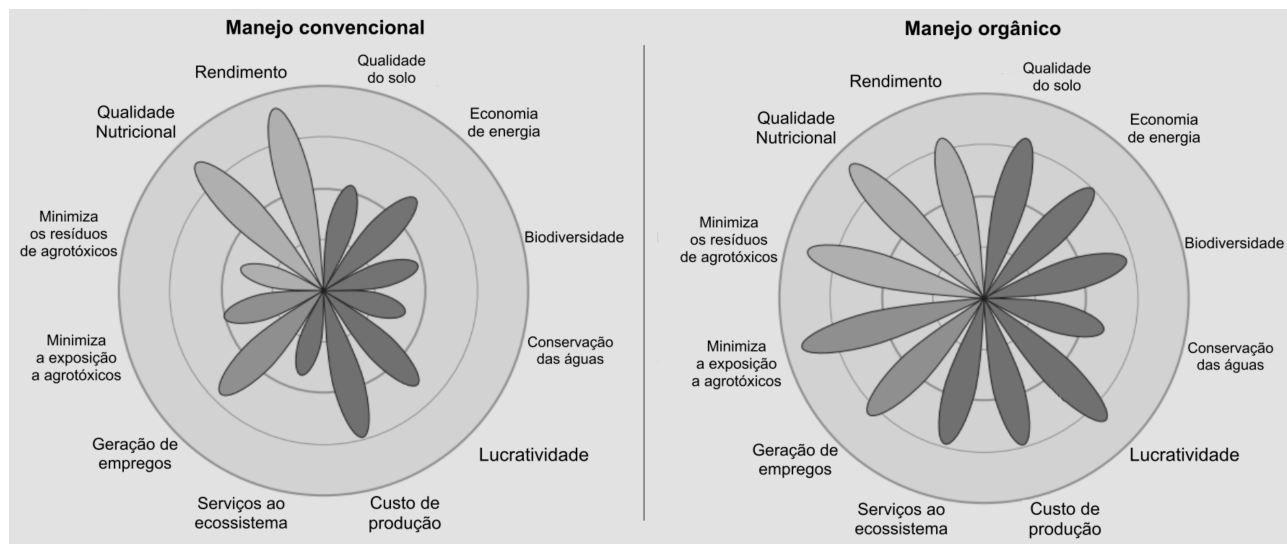


Figura 3.1: Vantagens associadas aos sistemas de cultivo. O comprimento das 12 pétalas das flores são qualitativamente baseado no estudo de Reganold e Wachter (2016) e indica o níveis da métrica de sustentabilidade relativo a cada círculo 25, 50, 75 e 100%. Os tamanhos das pétalas ilustra que o sistema da fazenda orgânica é melhor balanceada nas quatro áreas de sustentabilidade

O sistema orgânico estimula mais o uso das práticas de manejo do que de insumos externos, considerando que condições regionais requerem sistemas adaptados às suas particularidades locais. Isto é realizado pelo uso, sempre que possível, por métodos agrônômicos, biológicos, e mecânicos, em vez da utilização de insumos sintéticos, para cumprir alguma função específica dentro deste sistema (Session, 2014). Destacando algumas diferenças entre os dois manejos, orgânico e convencional, na figura 3.1.

Segundo Reganold e Wachter (2016), a agricultura orgânica ajuda os produtores a receberem um preço mais alto pelo seu produto, enquanto se esforçam para atender à crescente demanda do consumidor. Além do que a agricultura orgânica tem sido capaz de fornecer empregos, ser mais rentável, beneficiar o solo e o meio ambiente e apoiar interações sociais entre os produtores e consumidores.

3.4 Legislação sobre Agricultura Orgânica

A lei n. 10.831, de 23 de dezembro de 2003 do Brasil, rege a produção, processamento, rotulagem e comercialização dos produtos orgânicos no país. Através dela é possível a rastreabilidade orgânica de toda a cadeia produtiva e o livre acesso aos locais de produção ou processamento dos mesmos. O MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), regula o Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica (SisOrg), que é formado também por órgãos de fiscalização dos Estados, junto do

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), o responsável pela acreditação dos Organismos de Avaliação da Conformidade (OAC) interessados em atuar na certificação.

A certificação desses produtores garantem que os mesmos irão cumprir uma série de elementos em todas as fases de produção, como: as práticas de manejo sustentável de recursos naturais e resíduos gerados, a preservação da biodiversidade dos ecossistemas naturais, o uso racional do meio ambiente (solos, mananciais e atmosfera) e prevenção da fauna regional.

Os responsáveis pela legislação nos Estados Unidos é o Programa Nacional Orgânico (*National Organic Program - NOP*) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture - USDA*). O mesmo é incumbido pelo desenvolvimento de normas para a produção orgânica e também acreditação das agências de certificação. As diretrizes são empregadas para todos os aspectos das cadeias produtivas.

A FAO possui alguns critérios para a produção, processamento e comercialização de alimentos orgânicos, que estão presentes na coletânea *Codex alimentarius* (Organization et al., 2001).

Outra organização que é dedicada a estabelecer normas internacionais relacionadas ao sistema de produção orgânica é a IFOAM, uma Organização Não Governamental, que criou o Serviço Internacional de Acreditação Orgânica (*International Organic Accreditation Service - IOAS*) para acreditação de agências de certificação. Desde 1999, a IFOAM foi registrada pela Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization - ISO*), como uma organização internacional de padronização para a agricultura orgânica (Willer et al., 2018).

A União Europeia também possui a sua legislação baseada nos padrões IFOAM e é constituída pelos regulamentos: (CE) nº 834/2007 (Häge, 2007), referente à produção e à rotulagem de seus produtos, enquanto a (CE) nº 889/2008 (Commission, 2008) estabelece normas de execução do regulamento (CE) nº 834/2007.

3.5 Microbioma e a Rizosfera

Sabendo das diferentes formas de cultivo existentes e suas normativas, é importante entender que a produção vegetal e sustentabilidade dependem de diversos fatores, e dentre eles colocaremos em escopo os microrganismos associados a uma planta, devido a seu papel determinante no desenvolvimento da mesma por realizarem associações de simbiose com plantas próximas, selecionando dinamicamente aqueles que os beneficiam e tentando reprimir da maneira possível os que são patogênicos (Turner, James, Poole, 2013).

A associação que os microrganismos realizam com a cana-de-açúcar nos diferentes locais da planta foi descrita no estudo de Souza et al. (2016), que verificou a alteração da estrutura das comunidades de microrganismos em relação aos diferentes compartimentos da planta, tanto os endofíticos, quanto os exofíticos.

Os ambientes associados às plantas são colonizados em intensa abundância e diversidade por microrganismos, em especial a rizosfera, que é definida como a região do solo proximamente associada a raiz da planta e que está sujeito a influência radicular (Bakker et al., 2013a).

A denominação rizosfera partiu de Lorenz Hiltner em 1904, anteriormente definida como "zona do solo próxima das raízes de leguminosas com alta intensidade de atividade microbiana" (Shaikh, Wani, Sayyed, 2018). Lorenz enfatizava que a atividade microbiana desse ambiente interfere na nutrição e na saúde da planta. Em suas descobertas, ele destacou dois tópicos de extrema importância: a relação entre a rizosfera e crescimento e o desenvolvimento das plantas e qual é a atuação dessa região para patógenos e doenças (Lynch, Leij, 2001).

Por sua riqueza de nutrientes essa área do solo é influenciada pelas raízes das plantas, que seleciona positivamente e negativamente os microrganismos ali presentes, especialmente aqueles que se relacionam benéficamente em associação a ela, ou desestimulam o desenvolvimento dos desfavoráveis (Lugtenberg, Leveau, 2007).

Salientando a importância do solo como um dos principais reservatórios de diversidade microbiana. Neste ambiente há uma imensa diversidade de microrganismos. Considerando apenas bactérias, as estimativas revelam que as mesmas representam, por grama de solo, 8,3 milhões de espécies (Roesch et al., 2007).

Os microrganismos à pertencentes a microbiota do solo são determinados em especial pelas plantas, o tipo de solo e o manejo em questão. Como resultado, podem afetar a diversidade e estrutura da comunidade de microrganismos colonizadores dos tecidos vegetais, com consequências para a fitossanidade (Garbeva, Veen, Elsas, 2004; Roesch et al., 2007).

Produtos químicos sintéticos tais como hidrocarbonetos, pesticidas, solventes, sais e metais pesados provocam influências sob as comunidades de microrganismos (Griffiths, Philippot, 2013), muitas vezes gerando desequilíbrios. De acordo com Newman et al. (2016), que considerou os efeitos da aplicação de glifosato em comunidades microbianas presente na região da rizosfera, seu estudo detectou alterações nessas comunidades, particularmente para o filo *Acidobacteria* e para a família *Xanthomonadaceae*.

Não obstante, as plantas hospedam um microbioma específico em sua rizosfera que sofre alterações conforme as diversas variações bióticas e abióticas às quais estão

suscetíveis, como por exemplo os fatores edáficos - temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, conteúdo de nitrogênio, fósforo, umidade, tipo de solo, proporção de argila, adição de fertilizantes e sistema de manejo do solo (Brimecombe, Leij, Lynch, 2007; Köberl et al., 2013; Chaparro et al., 2012).

Em contrapartida, os microrganismos que não estão associados a raiz competem pelos poucos nutrientes que estão presentes no solo livre, e desta forma, sua proliferação acaba sendo baixa em comparação com a área rizosférica (Berendsen, Pieterse, Bakker, 2012). Porém, quando esses microrganismos estão associados à região da raiz eles demonstram uma atividade intensificada, devido as plantas realizarem um processo conhecido como exsudação, intitulado também como rizodeposição, que consiste na aglutinação de compostos biologicamente ativos - secreção de íons, água, enzimas, mucilagem, além de uma variedade de compostos carbônicos em metabólitos primários e secundários (Bais et al., 2006; Doornbos, Loon, Bakker, 2012).

Dessa forma, os microrganismos se aproveitam dos nutrientes exsudados da raiz para o seu crescimento, retornando benefícios às plantas.

Como a nodulação, que auxilia na fixação de nitrogênio, a solubilização de nutrientes que contém fósforo, aumentando sua disponibilidade e antagonismo em relação aos microrganismos patogênicos, melhorando as estruturas do solo e também possibilitando a biorremediação de poluentes, retendo moléculas de metais pesados e de compostos xenobióticos (derivados principalmente de agroquímicos) e, desta forma, essa comunidade de microrganismos que está presente na rizosfera, contribui para estimular o crescimento das plantas (Bais et al., 2006; Bakker et al., 2013a; Turner, James, Poole, 2013; Ahemad, Kibret, 2014).

Esses microrganismos que participam do desenvolvimento e crescimento das plantas recebem um nome específico de PGPR - rizobactérias promotora de crescimento em plantas (Egamberdieva, Shrivastava, Varma, 2015). Esse conjunto de bactérias desempenham uma papel importante para as plantas, atuando de forma mais eficiente na colonização da superfície das raízes, se multiplicando e competindo pela região com outras microbiotas e, em sua maioria, o grupo ajuda na promoção de crescimento (Ahemad, Kibret, 2014). Esse termo foi cunhado em 1978 por Kloppe e Schroth (1981), demonstrando nessa ocasião os benefícios desses microrganismos na função de auxiliar a promoção de crescimento das plantas.

Além de todas as vantagens já citadas sobre as PGPRs, ainda podemos destacar que elas contribuem de muitas formas na promoção de crescimento e manutenção da homeostasia da planta, através do auxílio na produção e regulação de fitormônios. Um desses mecanismos é a diminuição da concentração de etileno mediante a produção de ACC desaminase. Também contribuem para a aquisição de minerais inorgânicos, como

pelo mecanismo de solubilização de fósforo na forma de fosfato. Por fim, elas ainda participam da produção de sideróforos para aquisição de ferro, enzimas hidrolíticas e produção de antibióticos (Shaikh, Wani, Sayyed, 2018).

Ademais, os estudos de Shaikh, Wani e Sayyed (2018), demonstram que as PG-PRs se apresentam como uma possível alternativa para a biorremediação de solos contaminados com agroquímicos (fertilizantes, herbicidas, inseticidas).

Não menos importante, é relevante destacar que o solo e o seu microbioma é considerado um ambiente que condiciona os resíduos de antibióticos. Então a comunidade presente naquele ambiente é afetada, desenvolvendo uma população de microrganismos resistente a antibióticos (Guo et al., 2018).

Uma das principais vias para que o ser humano entre em contato com esses microrganismos resistentes e genes de resistência é o microbioma do solo e vegetal, pois são fontes de disseminação da resistência, o que destaca a necessidade de compreensão do resistoma microbiano - conjunto de elementos genéticos e não-genéticos de resistência a antibióticos, para melhor gerenciar os riscos associados a contenção e escape da resistência a antibióticos através dos alimentos (Su et al., 2017; Chen et al., 2019).

Os microrganismos presentes na rizosfera possuem um papel fundamental para aquisição de nutrientes para a planta, tolerância ao estresse abiótico e proteção contra vírus e diferentes patógenos via resistência sistêmica induzida (RSI), além da ativação do sistema imune das plantas em resposta aos ataques nas regiões das folhas. Porém, a utilização desses recursos que a rizosfera e as plantas usam, podem acabar facilitando a disseminação de genes de resistência a antibióticos, o que pode colocar a saúde humana em risco com a ingestão desses alimentos (Chen et al., 2019).

Um outro ponto importante para ressaltar é que dados demonstram que os procedimentos da produção orgânica pode facilitar a dispersão dos genes de resistência a antibióticos no solo, na maioria das vezes devido a utilização de resíduos de animais para a adubação do solo. Isso evidencia a importância de otimizar a eliminação dos resíduos não desejáveis e sua reciclagem, para então estar apropriado para o uso (Udikovic-Kolic et al., 2014; Fahrenfeld et al., 2014).

Estudos sugerem que uma alternativa é a utilização do biochar (um tipo de bio-carvão), que está se tornando comum para remediação de solos. Outra opção é realizar a compostagem do adubo orgânico e solo para tentar reduzir o nível e potencial de disseminação de genes de resistência a antibióticos (Duan et al., 2017; Cui et al., 2016; Levy et al., 2018).

A seguir apresentaremos os avanços que permitiram compreender as interações microbianas, através da geração de grandes volumes de dados, nas quais ocorrem

as respostas dos microrganismos ao estresse ambiental, a relação da microbiota com agentes deletérios no ecossistema e não menos importante a transferência horizontal de genes (Bertrand et al., 2015).

Essas respostas podem ser amparadas pelas técnicas denominadas de "ciências ômicas", que correspondem a dois tipos de análises complementares. A primeira delas é o conhecimento das moléculas biológicas de um dado ambiente - especialmente ácidos nucleicos e proteínas. A segunda técnica complementa a primeira, e se baseia na aquisição computadorizados destas moléculas - ou seja, o conhecimento de sua sequência, seguido de análises exploratórias dos dados, na qual a pesquisa e as questões são levantadas conforme se compreende mais profundamente estes dados. Este conceito que se traduz, na prática, como uma perspectiva de condução de estudo, foi proposto pelo estatístico John Tukey (Yu, 1977), e é amplamente aplicado na investigação de dados complexos, com diversas fontes de ruídos.

3.6 Bioinformática

A bioinformática começou a pelo menos 40 anos, a partir de um conjunto de técnicas e práticas para análises de dados moleculares. Segundo Luscombe, Greenbaum e Gerstein (2001), essa disciplina deriva da biologia molecular que a conceitua em termos de moléculas no sentido físico-químico, sobre as quais se lançam técnicas de informática para análise, técnicas essas que são derivadas de disciplinas como matemática aplicada, estatística e ciência da computação, que permitem compreender e organizar informações associados a essas moléculas em larga escala.

A bioinformática acompanha também o nascimento da era das ciências "ômicas" do sufixo inglês "-omics", um neologismo grego adaptado ao americano, que significa "a totalidade" (Wiktionary, 2019). Essa totalidade se refere à análise coletiva de moléculas biológicas para compreensão aprofundada dos seres vivos, e nessas áreas se encaixa a genômica - que se refere a análise coletiva de conjuntos de genes. A história dos avanços da metagenômica e compreensão da ecologia de microrganismos é entrelaçada com o desenvolvimento das tecnologias de biologia molecular, e a linha do tempo dos avanços e conquistas da área podem ser vistos na fig. 3.2

Porém, para a bioinformática se consolidar como disciplina fundamental, ocorreu alguns fatos importantes, como a descoberta da estrutura do DNA, a construção dos DNAs recombinantes, a criação e a popularização da internet, e o desenvolvimento dos algoritmos de alinhamento, como por exemplo o BLAST (Xiong, 2006; Moreira, 2015; Altschul et al., 1990).

Para alcançar o melhor desempenho das tecnologias de sequenciamento automatizadas foi necessário a aquisição de diversos tipos de conhecimento que se baseiam

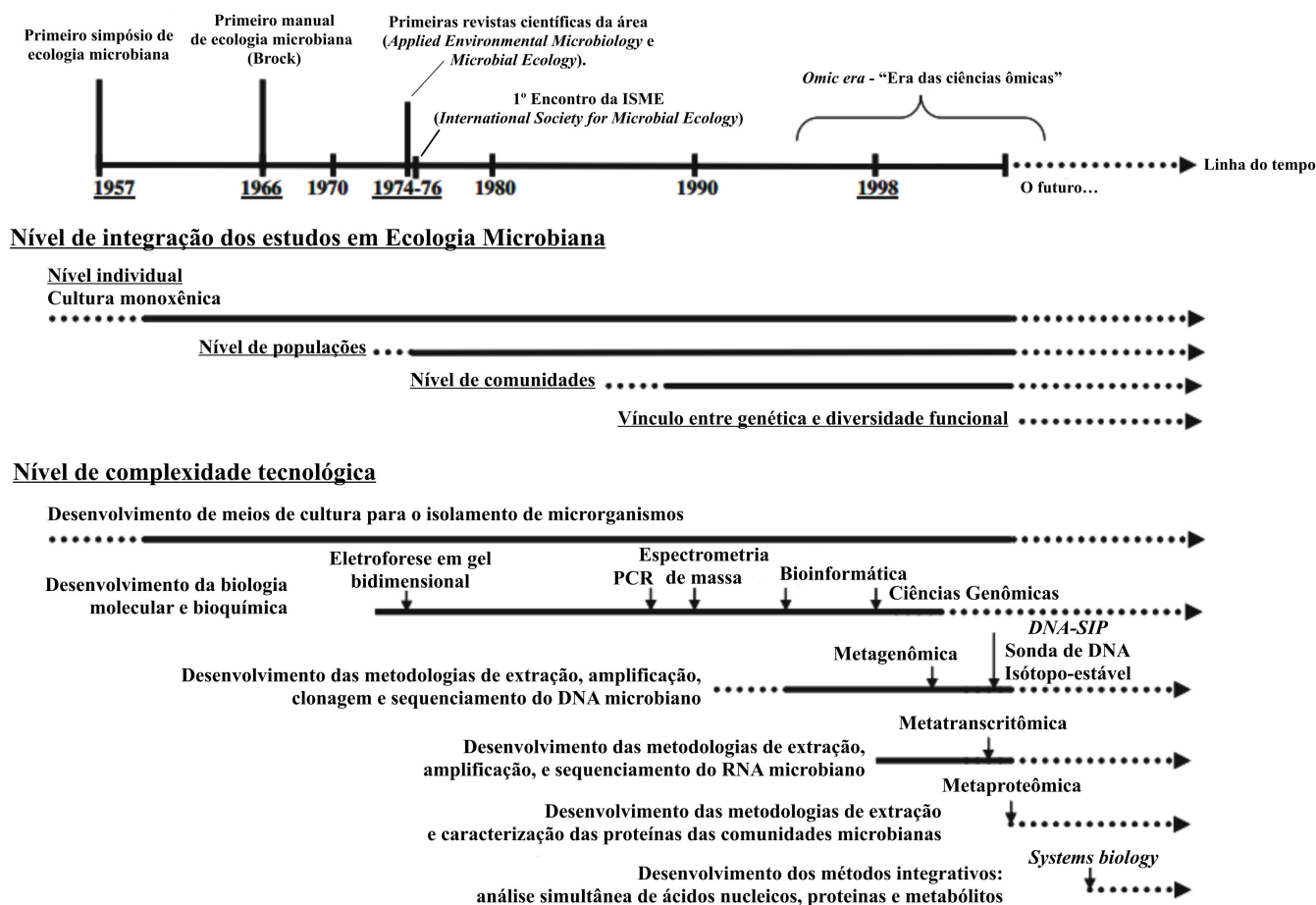


Figura 3.2: Desenvolvimento histórico da metagenômica no contexto da ecologia microbiana. (Maron et al., 2007)

na compreensão de química, de engenharia, de software e de biologia molecular, o início de tudo foi sequenciamento de DNA pelo método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo desenvolvido por Anderson et al. (1981) (Masoudi-Nejad, Narimani, Hosseinkhan, 2013).

Pevsner (2015) diz que a habilidade de se sequenciar genomas inteiros e a rápida difusão da utilização de metodologias de sequenciamento de alto rendimento, promove em alta velocidade uma forma de se realizarem investigações biológicas. O conhecimento se estendeu não apenas para pesquisas nos campos da biologia, mas para diversas áreas tal como na medicina, onde há o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças. Além disso, têm provido informações que fornecem o suporte para descobertas de novas aplicações dos microrganismos na agropecuária e indústria.

Através dos investimentos ocorridos no período do sequenciamento do genoma humano, aconteceu um desenvolvimento acelerado das técnicas e protocolos de sequen-

ciamento de leituras curtas, e desta forma, simultaneamente ocorreu o crescimento das metodologias moleculares necessários para o estudo das diversas moléculas biológicas, expressão do RNA, as interações proteínas-DNA e estudos integrativos de ambiente completos, como a metagenômica (Shendure, Ji, 2008). E, com esses protocolos se desenvolvendo, foi possível ampliar os conhecimentos sobre microrganismos associados aos humanos e aos ambientes. Dessa maneira os diversos métodos "ômicos" foram sendo adaptados para tentar compreender essas relações microbianas (Franzosa et al., 2015).

No momento atual a bioinformática se insere no contexto da chamada expansão exponencial do volume de dados, conhecido como fenômeno "*Big Data*", que procura a resolução de problemas através do processamento de grande volumes de dados, utilizando de ferramentas que possam ser empregadas com performance suficiente para a análise dos mais diversos ambientes (Buffalo, 2015).

Das diferentes tecnologias que foram criadas, a metodologia que foi utilizada para as análises de rizosfera da cana-de-açúcar, foi o sequenciamento por síntese Illumina, antiga Solexa, que estabelece as sequências de nucleotídeos através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) em superfície, sendo conhecida também como *bridge* PCR em pontes (Masoudi-Nejad, Narimani, Hosseinkhan, 2013).

O método Illumina, comparado a outras tecnologias, é considerado muito rápido, sendo que o mesmo gera sequências de ao menos 150 bases, além de haver corridas de sequenciamento de até 600 bases. Na tecnologia, Illumina não se faz necessário o preparo de uma eletroforese em gel (como era realizada na técnica de sequenciamento de Sanger) e também está isenta de problemas como homopolímeros, que estão presentes nos sequenciamentos de nova geração. A plataforma Illumina é responsável por cerca de 80% dos sequenciamentos de nova geração realizados (Pevsner, 2015).

Na análise estrutural dos genomas, é utilizado o sequenciamento completo de fragmentos aleatórios do genoma (shotgun sequencing), do inglês, Whole Genome Sequencing (WGS). Esse tipo de sequenciamento permite investigação mais ampla da comunidade, e dessa maneira facilita as análises em níveis de diversidade filogenética e polimorfismos entre espécies, permitindo ainda estudar as diferentes vias metabólicas e o complemento genético, entre outras diversas análises. Sendo possível ainda reconstruir genomas inteiros ou parcialmente, podendo também descobrir novos genes (Loman, Pallen, 2015; Grada, Weinbrecht, 2013; Chen, Pachter, 2005).

Uma das diferenças que se pode destacar é o tamanho das leituras que são geradas, no WGS, a profundidade dessa leitura possui uma relação direta com a abundância dos dados, conseguindo separar as que possuem alta e baixa abundância. Com o desenvolvimento das técnicas de WGS, se tornou possível a recuperação de novos

genes e genoma, sem ter que necessariamente realizar o cultivo dos microrganismos em laboratório (Tringe et al., 2005).

Isso proporcionou uma difusão da metagenômica e a utilização da mesma para investigar diferentes ambientes e assim tentar responder questões fundamentais da ecologia microbiana como a diversidade genética, os papéis ecológicos da maioria dos microrganismos e a estrutura populacional em múltiplos ambientes (Riesenfeld, Schloss, Handelsman, 2004).

3.7 Metagenômica - estado da arte.

A metagenômica é o método utilizado para a análise total de um ambiente, e compreende a aplicação de estudos genéticos e genômicos para amostras complexas, frequentemente de origem ambiental. Segundo Handelsman et al. (1998) a metagenômica representa a análise dos genomas dos ambientes, ou no sentido de estar "além da genômica". Porém, os trabalhos realizados no passado indicavam análises de genes e genomas obtidos de ambientes não pelos métodos de sequenciamento massivos, mas através da clonagem em vetores e subsequentemente sequenciamento de baixo rendimento.

A derivação da metagenômica é evidentemente da genômica, no sentido de análise do conjunto total de ácidos nucleicos não limitados a um único genoma, que vem geralmente, de um clone ou microrganismo cultivado. Metagenômica que conhecemos hoje, intensiona investigar todos os genomas em um conjunto de amostras, tentando responder as perguntas: Quais são os genes presentes nos ambientes de interesse, como esse genes podem influenciar as atividades uns dos outros? Além disso, permite também obter informações acerca da composição genética da comunidade e suas possíveis atividades metabólicas (Wooley, Godzik, Friedberg, 2010; Council et al., 2007).

Os passos principais para um estudo de metagenômica são: a obtenção e processamento de amostras ambientais cujo acesso ao DNA total da comunidade seja possível; o sequenciamento automatizado em larga escala dos ácidos nucleicos e a análise computacional desse volume de dados, que geralmente compõe duas divisões: a análise funcional e a análise taxonômica e de diversidade microbiana (Vieites et al., 2010).

As técnicas de sequenciamento automatizado foram especialmente aceleradas pelos protocolos referentes à tecnologia Illumina, como as plataformas HiSeq2000 e MiSeq, que são rotineiramente utilizadas para o sequenciamento de metagenomas (Caporaso et al., 2012), as quais geram leituras de tamanho típico de até 250 pares de bases (p.b.), sendo que uma corrida típica produz de dezenas de milhões de leituras,

até bilhões para uma única amostra - tais leituras precisam ser montadas se a intenção é a de recuperar informações úteis dos genomas.

Mesmo para um único organismo, o problema de montagem é incrivelmente complexo, o que coloca em proporção a dificuldade da montagem de metagenomas, que se consistem muitas vezes em muitos genomas sequenciados com coberturas muito diferentes, em amostras mistas com milhares de espécies diferentes. Essa complexidade justifica a necessidade de algoritmos especiais para a realização da montagem de metagenomas, que necessitam ser computacionalmente muito eficientes, requerendo quantidades imensas de recursos como memória, espaço em disco e processadores (Breitwieser, Lu, Salzberg, 2017).

O processo de montagem gera regiões de porções genômicas maiores que as leituras, chamadas de sequências contíguas ou *contigs*, que são comparados com catálogos de referências de genomas e genes de microrganismos com a finalidade de atribuir informações às porções montadas.

Para realizar essas análises pode-se utilizar bancos de dados como, por exemplo: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), *Clusters of Orthologous Groups* (COGs) e *UniProt Reference* (UniRef) (Kanehisa et al., 2013; Tatusov, Koonin, Lipman, 1997; Suzek et al., 2007). Com as montagens, também se estabelece a abundância das espécies encontradas por métodos de contagem ou quantificações (Franzosa et al., 2015), que permitem a comparação dessas regiões entre conjuntos de amostras.

Outra abordagem da metagenômica, por vezes chamada de metataxonômica, é considerada mais específica, na qual se aplica o sequenciamento massivo de uma amostra ambiental, cujo material de origem são um ou poucos genes, ou ainda uma família de genes de interesse, ou até mesmo um marcador filogenético como, o RNA ribossomal 16S (16S) ou as regiões espaçadoras internas transcritas (*Internal Transcribed Spacer* - ITS) da região em eucariotos (Lazarevic et al., 2012; Schoch et al., 2012). Essa técnica de análise investiga amostras ambientais com todos os microrganismos presentes, compreendendo apenas alguns genes marcadores selecionados e amplificados. Essas regiões são amplificadas por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para determinada região de interesse, que posteriormente serão sequenciadas (White et al., 2017; Caldwell et al., 2015).

O gene 16S ribossomal possui um lugar especial nos estudos de microbiomas, evolução e ecologia de microrganismo. Isso ocorre devido as propriedades incomuns, como: as sequências conservadas, ubíquas e as estruturas de domínio com *taxa* evolutiva variável, o que permite análises em diversos contextos (Tringe, Hugenholtz, 2008).

Além disso, em outra perspectiva, de natureza mais funcional, estão as chamadas

bibliotecas metagenômicas, que são construídas em um hospedeiro heterólogo, que em seguida serão rastreados e a partir de onde é possível por uma atividade de interesse, como, a expressão de uma enzima específica. Realçando que a metagenômica apoiada na sequência funcional possibilita análises mais detalhadas e tenta detectar as estruturas das comunidades microbianas (Desai, Pathak, Madamwar, 2010; Jovel et al., 2016).

Deste modo a metagenômica tem a finalidade de investigar a natureza genômica e o potencial funcional, enquanto o 16S busca pelo perfil taxonômico dos organismos em um dado ambiente, um trabalho que requer menor capacidade de processamento para a categorização dos organismos no local amostrado, e ocasionalmente pode vir a fornecer evidências do conteúdo gênico local (Caporaso et al., 2011). É válido dizer que ambos os procedimentos com a denominação de metagenômica (metagenoma total e metataxonômica) são procedimentos que podem ser utilizados de maneira complementar, a fim de investigar a diversidade bacteriana e fúngica.

Agora, revemos alguns dos principais achados da metagenômica e metataxonômica. Os procedimentos da metagenômica são aplicados a outros organismos que da mesma forma portam suas próprias microbiotas, principalmente na busca de potenciais aplicações biotecnológicas das mesmas. Uma das formas de fazer acontecer essa busca por aplicações biotecnológicas é empregando as análises de metagenômica, que foi utilizada com sucesso em vários ensaios de ambientes diferentes, incluindo, o solo. No trabalho de Lopes, Silva e Andreote (2016), eles buscaram as comunidades que estão presentes na rizosfera da cana-de-açúcar, além de encontrar possíveis genes associados com a formação de biofilmes e com os processos de transferência horizontal de genes.

Köberl et al. (2013) lançaram mão da técnica de metagenômica e verificaram diferenças acentuadas nas comunidades de microrganismos quando foram comparados o solo desértico com um sistema agrícola orgânico do mesmo local, cultivado há ao menos 30 anos. Utilizando de análises in silico os autores evidenciaram que esse sistema de cultivo alterou radicalmente a estrutura e função da comunidade de microrganismos, verificando, ainda uma intensificação dos efeitos benéficos às plantas no cultivo orgânico.

Em outro trabalho também de metagenômica, Lupatini et al. (2013) mostraram que o sistema orgânico acarreta impactos benéficos ao solo, por meio da estrutura da comunidades de microrganismos; quando comparados os solos sob atividade agrícola em que se aplicou fertilizantes sintéticos em comparação àqueles em que foram aplicados fertilizantes orgânicos.

No trabalho de Fierer et al. (2012) a metagenômica foi utilizada na comparação de

comunidades microbianas em diferentes biomas. No estudo, os mesmos compararam a composição e função de solos coletados em desertos frios, desertos quentes, florestas, pastagens e tundra, conseguindo concluir que as comunidades de microrganismos são bem distintas entre os biomas comparados a osmorregulação e dormência associados aos solos do deserto, os autores identificaram menor abundância de genes regulatórios do ciclo de nutrientes e catabolismo de compostos orgânicos das plantas.

Utilizando a metodologia de análise metagenômica baseada em DNA total, está sendo possível encontrar, e com ênfase prover informações e promover soluções biotecnológicas, agropecuárias e ambientais, tais como: investigação dos impactos do cultivo das palmeiras-de-óleo, (Tripathi et al., 2016), obtenção de enzimas celulolíticas de solos cultivados com cana (Alvarez et al., 2013) e, por fim, também de compostagem do bagaço da cana (Colombo et al., 2016), entre outros estudos cujos objetivos foram a investigação taxonômica e funcional de um ambiente.

Até a data do presente trabalho, não existem ainda estudos com a técnica da metagenômica total para compreensão do microbioma da cana-de-açúcar, especialmente com o viés comparativo proposto por nós - o de manejo convencional versus orgânico, uma lacuna de conhecimento que poderá avançar tanto o entendimento do impacto do manejo sobre a microbiota, quanto dar o pontapé inicial em informações para a geração de tecnologias como bioinoculantes, pela prospecção de comunidades microbianas.

Materiais e Métodos

4.1 Descrição do local e amostragem

As amostras de solo da rizosfera de cana-de-açúcar foram obtidas em dois talhões sob os modos de manejo orgânico (MO) e convencional (MC), ambas da cultivar CTC9001 (Centro de Tecnologia Canavieira). Foram realizadas 3 amostragens em cada talhão, a partir de 3 pontos equidistantes, aproximadamente 50m, desconsiderando a região de bordadura.

O local dos pontos amostrados foram definidos previamente usando GPS. Dessa forma, constituiu 3 réplicas para cada metagenoma, as quais foram nomeadas de acordo com o modo de cultivo e o dia de coleta (manejo orgânico: ORZ2, ORZ3 e ORZ4; manejo convencional: CRZ2, CRZ3 e CRZ4). O experimento foi registrado no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado).

As coletas dessas plantas foram realizadas em dois talhões separados um do outro por cerca de 100m, no município de Jaboticabal-SP, nas fazendas São José e São Sebastião. (Figura 4.1)

A fazenda São José era cultivada sob manejo convencional até os anos 2000, quando iniciou o processo de conversão para a agricultura orgânica, em conformidade com as especificações de agências certificadoras, que a certificou em 2006 (DBO, 2016). Hoje, a fazenda possui certificação conforme a normativa Brasileira (Brasil, 2003), a normativa Estadunidense USDA (USDA, 2017) e também pela União Europeia (Commission of the European Communities, 2010).

Os plantios foram realizados no mesmo período com diferenças de alguns dias, entre março e abril de 2017 (sistema de plantio de ano-e-meio). As coletas da rizosfera foram feitas aproximadamente 11 meses após o plantio, no primeiro trimestre de 2018, no final do período de crescimento vegetativo e início da maturação do canavial.

Dentro de cada talhão, foram coletadas 2 plantas ($\approx 2,5$ m de distância), a partir de 4 pontos equidistantes (≈ 50 m) selecionados em uma porção representativa do talhão, separadas entre si a uma distância mínima de ≈ 180 m (CP1 a OP4). As plantas

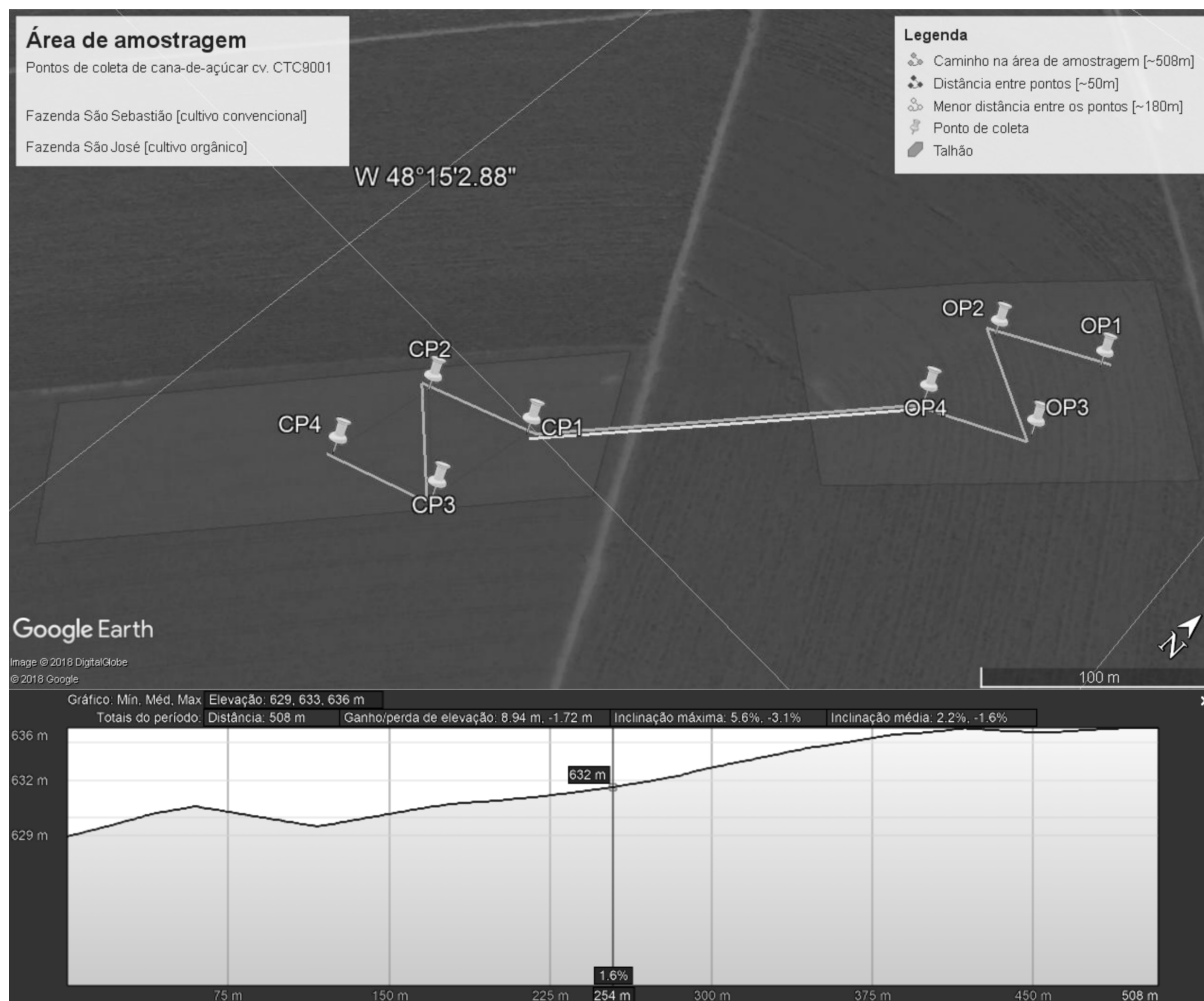


Figura 4.1: Mapeamento em sistema de posicionamento global (GPS) da amostragem. Área de amostragem: pontos das coletas na fazenda em manejo orgânico (pontos OP), São José, e em manejo convencional (pontos CP), da fazenda São Sebastião e perfil de elevação do local.

referentes a cada um dos pontos no talhão com manejo orgânico (MO) e no talhão com manejo convencional (MC) foram coletadas no mesmo dia, no período da manhã, para manter o pareamento das amostras por dia.

As plantas selecionadas possuíam colmos em torno de 15 entrenós. O solo no entorno do colmo principal de cada touceira era escavado considerando uma circunferência de 0,5 a 0,6 m (2 de diâmetro) com profundidade de até 0,5 m para que o colmo pudesse ser arrancado juntamente com as raízes. As raízes e o solo aderido às raízes (porção referente à rizosfera), foram acondicionados juntos em saco de plástico estéril, com capacidade de 20L.

O processamento do material teve início imediatamente após a coleta para evitar ou ao menos minimizar as perdas de biodiversidade pelo estresse relacionado ao

transporte até o laboratório.

O solo da região da rizosfera foi retirado no laboratório. As touceiras foram sacudidas para que o excesso de solo se soltasse das raízes, após isso, foi retirado o solo aderido das mesmas, tomando o cuidado de isolar apenas o solo fixo às raízes. Após recolher o material da rizosfera, ele foi peneirado, armazenado em microtubos, congelado em N_2 líquido e acondicionado a -80°C .

Além do material vegetal e solo rizosférico, também foram coletadas amostras de solo livre de raízes (6 sacos plásticos pequenos) em pontos nas linhas e nas entrelinhas. Para a coleta das amostras de solos livres de raízes utilizamos o trado (tipo holandês) em uma profundidade de 20 cm a partir da superfície. Todos os itens amostrados foram coletados utilizando luvas estéreis e ferramentas limpas e esterilizadas previamente, além de utilizarmos ferramentas distintas para cada talhão.

A acomodação dos itens foi realizada em recipientes também estéreis, os quais foram devidamente lacrados, rotulados e mantidos em caixas térmicas com gelo, para serem imediatamente encaminhados para o processamento no laboratório, (figura 4.2). Durante o transporte das amostras ao laboratório, que durou em média 30 minutos, as amostras permaneceram em baixa temperatura, evitando luz solar direta para assegurar a integridade das moléculas biológicas amostradas.

Os pontos de amostragem (Tabela 4.1) foram definidos previamente com o programa *Google Earth* (Google), e para localização dos pontos foi utilizado o software *Soil Sampler* (Farmis) do sistema operacional Android. Os 8 pontos foram amostrados em 4 dias de coletas, separados por um intervalo de 04 a 05 dias. No mesmo dia, eram coletados e processados 01 ponto de cada talhão (convencional e orgânico), mantendo pareados os dias das coletas. Os dados climatológicos da (tabela 4.2) foram extraídos de dados pertencentes ao acervo da área de Agrometeorologia do Departamento de Ciências Exatas (UNESP).

As observações foram feitas na Estação Agroclimatológica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) de Jaboticabal/SP ($21^\circ 14' 05''$ S; $48^\circ 17' 09''$ W, Altitude 614,01 m). Os dados coletados referem-se ao período do cultivo da cana-de-açúcar, no ano 2017, no último período pré-coleta (verão), nas semanas de coleta (5 dias antes) e especificamente nos horários de coleta das amostras, além dos obtidos com termohigrômetro digital (Icel HT-4010) no local da coleta. A temperatura do solo nos pontos de coleta foi obtida com termômetro (de mercúrio) para solos.



Figura 4.2: Esquema de coletas. Da esquerda para direita, de cima pra baixo: área de coleta, colmos coletados em saco de ráfia esterilizado, trado holandês e raízes arrancadas do solo para a coleta.

Tabela 4.1: Localização geográfica dos pontos de amostragem, data da coleta e dados ambientais.

Amostra	Latitude	Longitude	US	TS	TA	UA	PA	Data
CRZ1	2111'22.67"S	4814'58,31"O	14,43	21,9	21,80	86,82	940,50	22/02/2018
CRZ2	2111'23.27"S	4814'59,92"O	17,98	23,0	21,42	93,01	943,70	27/02/2018
CRZ3	2111'24.28"S	4814'58,56"O	15,70	22,9	23,49	79,94	942,50	03/03/2018
CRZ4	2111'24.88"S	4815'00,17"O	14,84	23,5	21,20	95,24	941,00	08/03/2018
ORZ1	2111'15.69"S	4814'52,70"O	18,82	22,5	26,41	70,36	940,10	22/02/2018
ORZ2	2111'16.46"S	4814'54,23"O	17,95	22,6	25,47	75,40	944,10	27/02/2018
ORZ3	2111'17.33"S	4814'52,76"O	17,92	23,1	28,00	61,05	943,10	03/03/2018
ORZ4	2111'18.06"S	4814'54,32"O	17,08	22,7*	24,72	78,57	941,70	08/03/2018

US: Umidade do solo (%), TS: Temperatura do solo (°C), TA: Temperatura atmosférica (°C);
UA: Umidade do ar (%); PA: Pressão atmosférica (hPa), *: temperatura estimada

Tabela 4.2: Dados climatológicos no período de cultivo - (ano de 2017), no período compreendendo as datas das coletas (verão de 21 de dezembro de 2017 a 20 de março de 2018) e nos 5 dias anteriores às datas de coleta.

Período	Pressão	Tmax	Tmin	Tmed	UR	Prcp.	ND	RS
Anual (2017)	9442,00	30,10	17,10	22,70	67,60	1206,50	101	ND
Sazonal (verão)	941,95	30,57	19,82	24,23	76,31	468,40	49	20,75
17/02	941,90	29,34	19,22	23,38	78,62	13,6	3	19,46
22/02	942,02	30,16	19,38	24,38	74,22	10,3	1	21,13
26/02	943,70	29,92	20,64	23,50	82,46	38,9	3	17,24
03/03	940,90	32,10	20,44	25,64	73,26	6	2	23,51

Tmax: temperatura máxima (°C); Tmin: temperatura mínima (°C); Tmed: temperatura média (°C);
UR: umidade relativa (%); Prcp.: precipitação (mm); ND: Número de dias com chuva, RS: Radiação solar
Pressão: pressão atmosférica (hPa), RS: Radiação solar (MJ.m⁻²)

4.2 Especificações sobre os manejos dos talhões convencional e orgânico

A seleção dos talhões foi feita por diversos motivos. Primariamente, pois compartilharam o mesmo cultivar (CTC 9001), plantado com cana-planta, com início de plantio semelhante (março/2017), e por possuírem a menor distância entre talhões disponíveis para coletas na propriedade, o que garantiu uma maior consistência na textura do solo e topologia do terreno, (figura 4.1). A proximidade ainda garantiu a semelhança composição química do solo. Dessa forma, podemos considerar que as diferenças observadas entre os dois grupos se devem justamente à forma de manejo.

O preparo do solo para o plantio nos dois talhões é similar, passando por aração, gradagem e subsolagem. Na reforma desses canaviais são plantadas leguminosas: amendoim, soja ou crotalária, que após colhidas, o material vegetal restante é revolvido junto ao solo no preparo.

Durante a reforma no talhão orgânico, há aplicação de vinhaça no solo e no sulco de plantio, além de matéria orgânica em processo de decomposição (como torta de filtro, esterco de gado em confinamento, e material vegetal proveniente da

vegetação nativa da fazenda). A torta de filtro e a vinhaça são provenientes de usinas sucroalcooleiras com certificação de produção orgânica.

Ainda no manejo orgânico, foram feitas aplicações de bioinoculantes baseados em *Bacillus subtilis*, *Bacillus methylotrophicus*, *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*, os dois primeiros com o objetivo de controle biológico, e os dois últimos para a promoção de crescimento, todos aplicados no sulco de plantio da cultura anterior (de Soja), exceto *B. methylotrophicus*, que recebeu aplicação no início do plantio da cana.

No replantio, a adubação se inicia com a calagem, procedimento de correção da acidez do solo com suplementação de cálcio e magnésio, e fosfatagem utilizando fertilizantes minerais - calcário e rocha fosfatada. Nesse talhão, foram utilizados diversos produtos comerciais com o propósito de manejo de pragas e promoção de crescimento - em especial, fixação de nitrogênio, (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Insumos agrícolas utilizados na cultura orgânica de cana-de-açúcar.

Produto	Classificação	Ingrediente ativo	Dosagem/ha
Quality®	Fungicida	<i>Trichoderma asperellum</i> 1×10^{10} UFC/g	200g * / 100g **
Difere®	Fungicida	Oxicloreto de cobre 588g/L	ND
Rizos®	Nematicida	<i>Bacillus subtilis</i> $1,5 \times 10^9$ UFC/L	300 mL **
Onix®	Nematicida	<i>Bacillus methylotrophicus</i> $1,5 \times 10^9$ UFC/L	0,5 (L) *
Bouveriz®	Inseticida	<i>Beauveria bassiana</i> 8×10^9 UFC/g	50g *
Azos®	Promoção de crescimento	<i>Azospirillum brasilense</i> ABV5 1×10^9 UFC/L	1 L * / 300 mL **
Starfix®	Promoção de crescimento	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5079/5080	8 doses

*Aplicação no início do plantio (cobrição) **Aplicação no sulco de plantio da cultura anterior

No talhão do cultivo convencional, a adubação do solo foi realizada com calagem, utilizando gesso e calcário, e fertilização com adubo NPK (N, P_2O_5 e K_2O), na proporção 50-50-25, respectivamente. Além da adubação para o plantio, são aplicados inseticidas, fungicidas, herbicidas, além de fertilizantes de base composta orgânicos ou inorgânicos. (Tabela 4.5).

4.3 Parâmetros físico-químicos e composicionais do solo

Foram realizadas análises físicas e químicas dos solos e das plantas das mesmas áreas onde foram realizadas as coletas das amostras para extração de DNA. A coleta dos solos foi realizada com trado (profundidade ≈ 15 cm) em dez pontos de amostragem para cada área considerada, sendo esse material homogeneizado para composição de agrupamentos de amostra ou *pools* com peso de ≈ 500 g, correspondentes às amostras OBS0 e CBS0. Adicionalmente, foram realizadas análises para cada ponto de coleta, considerando um *pool* de amostras de 5 pontos no entorno da área de amostragem, num raio de 2 metros.

Tabela 4.5: Insumos agrícolas utilizados na cultura convencional de cana-de-açúcar.

Produto	Classificação	Ingrediente ativo (grupo químico)	Dose/ha
Orix®	Inseticida	Óleo mineral (HC alifáticos)	0,2 L
Nuprid®	Inseticida	Imidacloprido (Neonicotinoide)	1 Kg
Regent®	Inseticida	Fipronil (Fenilpirazol)	247.93g
Engeo Pleno®	Inseticida	Tiametoxam (Neonicotinoide); Lambda-Cialotrina (Piretroide)	1 L
Opera®	Fungicida	Epoxiconazol (Triazol) Piraclostrobina (Estrobilurina)	1 L
Comet®	Fungicida	Piraclostrobina (Estrobilurina)	0,495 L
Butiron®	Herbicida	Tebutiurum (Ureia)	1,65 L
Boral®	Herbicida	Sulfentrazone (Triazolona)	1,65 L
Poliflex®	Fertilizante	Pentóxido de fósforo - P ₂ O ₅ , 18% Nitrogênio - N, 3%	0,0062 L
Zintrac™	Fertilizante	Zinco - Zn, 40%; Nitrogênio - N, 1%	1,033 L
Bortrac™	Fertilizante	Boro - B, 10,9% Nitrogênio - N, 4,7% Óxido de potássio - K ₂ O, 5% Carbono orgânico total - 3,5% Zinco - Zn, 2%	1,033 L
Biozyme TF®	Fertilizante	Nitrogênio - N, 1,5% Manganês - Mn, 1% Enxofre - S, 1% Ferro - Fe, 0,4% Boro - B, 0,08%	0,495 L

Foram realizadas análises de pH, matéria orgânica (MO), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), acidez potencial (H+Al), soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC), saturação por bases (V%), Enxofre (S), Alumínio (Al), e de micronutrientes, Zinco (Zn), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Boro (B), além de análises granulométricas do solo. Para a quantificação dos caracteres químicos do solo foram utilizados os métodos descritos por Raij (2001):

1. pH em CaCl₂ por potenciometria;
2. H + Al em tampão SMP por potencioimetria;
3. MO por espectrofotometria;
4. P em resina por espectrofotometria;
5. S por turbidimetria;
6. Ca, Mg e K por espectrometria de absorção atômica;
7. Al em cloreto de potássio (KCl) por titulometria;
8. $SB = Ca + Mg + Na + K$;
9. $CTC = SB + H + Al$;

10. $V\% = (SB/CTC) * 100$
11. B por método de Azometina-H em espectrofotometria;
12. Cu, Fe, Mn e Zn: extração com solução ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), seguido de quantificação por espectrometria de absorção atômica.

Para a quantificação dos caracteres físicos do solo, foi realizada análise de granulometria determinando as frações de Argila, Silte e Areia (AG: Areia Grossa; AF: Areia Fina) de acordo com (Donagema et al., 2011), sendo os solos classificados entre argilo-arenosos e franco-argilo-arenosos.

A composição química do solo orgânico comparada ao convencional é semelhante para quase todos os parâmetros, apresentando pequenas variações significativas ($p\text{-valor} < 0.05$) somente para pH, teor de K e de Fe, no gráfico da (figura 4.3).

4.4 Extração de DNA total e sequenciamento

A extração de DNA total das amostras de solo rizosférico foi realizada utilizando o kit comercial *DNAeasy PowerSoil Kit* (Qiagen) com modificações, as amostras foram purificadas com *Agencourt AMPure XP* e armazenadas a -25°C . A quantidade de DNA nas amostras foi quantificada por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). As bibliotecas de DNA total foram construídas com o *Illumina Nextera DNA Sample Preparation Kit*, seguindo as recomendações do fabricante. O DNA das bibliotecas foi quantificado utilizando o *KAPA Library Quant Kit* (Roche) e a integridade foi verificada utilizando o kit *BioAnalyzer, Agilent DNA 1000 Kit*. A biblioteca controle PhiX (*Illumina Control Library*) foi empregada para garantir qualidade durante os processos de “clusterização”. O sequenciamento foi realizado usando o HiSeq Rapid SBS Kit v2 (500 ciclos) para produzir leituras pareadas de 2x250 em plataforma Illumina HiSeq2500.

4.5 Montagem do metagenoma referência

As sequências brutas foram pré-processadas utilizando um roteiro personalizado (Silva et al., 2019) que combina os programas FastQC (Andrews, 2010) para inspeção visual da qualidade, Atropos (Didion, Martin, Collins, 2017) para remoção de adaptadores e Prinseq (Schmieder, Edwards, 2011) para remoção de sequências de baixa complexidade e qualidade.

A montagem do metagenoma foi feita com o programa Megahit (Li et al., 2015), com o parâmetro *-presets meta-large*, indicado para metagenomas grandes e complexos, como o de solo. Esse programa faz uso de grafos *de Bruijn* sucintos para montagem, e não realiza procedimentos de particionamento e normalizações.

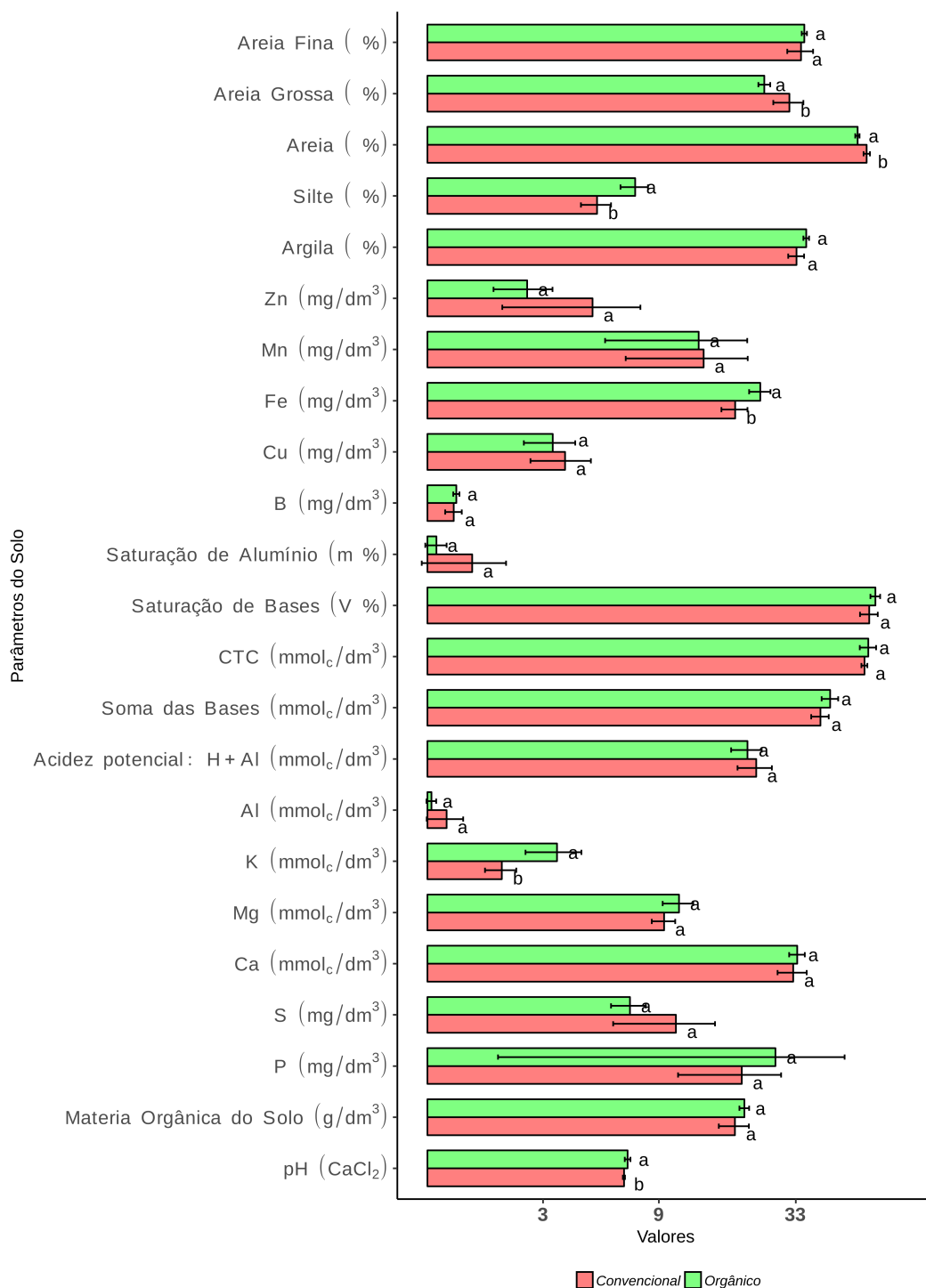


Figura 4.3: Parâmetros físico-químicos dos solos. Gráfico de barras das médias dos valores (com erro padrão) referentes aos parâmetros físicos e químicos avaliados no solo com cultivo orgânico versus cultivo convencional. As médias nas barras é referente à coleta de solos inicial, a partir de 10 pontos nos dois talhões (OBS0 e CBS0), juntamente com as 4 coletas em pontos específicos (OBS1:4 e CBS1:CBS4).

4.6 Predição e anotação funcional de proteínas

Os genes bacterianos foram preditos e anotados com o *pipeline* (conjunto de programas) do Prokka (Seemann, 2014), que realiza predição com o programa Prodigal (Hyatt et al., 2010), buscas em diversos bancos de dados com o BLAST+ (Camacho et al., 2009), que faz busca de similaridade contra bibliotecas de proteínas, e depois realiza busca de perfis de famílias proteicas com HMMER3 (Mistry et al., 2013), com a adição do parâmetro "*-metagenome*", otimiza predições para genomas altamente fragmentados.

Para melhor categorizar as proteínas preditas, foi executado ainda o *pipeline* do EggnoG-mapper (Huerta-Cepas et al., 2015; Huerta-Cepas et al., 2017) usando como critérios de classificação o tamanho mínimo de 150 e identidade mínima de 30%, critério considerado mínimo para atribuição cruzada de ortologia (Xiong, 2006).

Os genes preditos no metagenoma foram também anotados em relação a um banco de elementos de resistência a antibióticos (resistoma), o banco ARDB (Liu, Pop, 2008), que contém 23.137 genes de resistência, em 380 diferentes classes conhecidas. Essa anotação foi feita com o USEARCH v.11 (Edgar, 2010), com critérios de tamanho mínimo de sequência de entrada de 800 pares de base, identidade mínima de 60%, cobertura mínima da *query* de 40%, e e-value máximo de 1×10^{-6} . As porções genômicas com resistoma identificados foram cruzadas com a anotação do Kraken para os *contigs*, registrando a qual organismo pertenciam, e com o DESeq2 para conferir aqueles diferencialmente abundantes.

4.7 Predição taxonômica e análises de diversidade

A atribuição taxonômica às sequências para cálculos de diversidade foi predita utilizando-se duas estratégias, ambas baseadas na classificação das leituras e não das sequências contíguas (já montadas).

A primeira estratégia foi feita com o programa Kraken (Wood, Salzberg, 2014), com parametrização padrão, usando como referência o banco NT do NCBI adicionado de todos os genomas de bactérias, arqueias e fungos depositados no NCBI disponíveis em março de 2019, com nível de montagem (*Assembly level*) no mínimo a nível de cromossomo, o que garante um nível maior de confiança à sequência.

O programa Kraken realiza essa identificação através de uma estratégia de mapeamento de *k-mers*, mapeando as sequências-alvo de entrada ou *queries* contra o banco de dados personalizado descrito acima (*subject*), já indexado pelo programa em um processamento anterior, havendo a atribuição de resultado a partir de um algoritmo

chamado Ancestral Comum mais Próximo (*Lowest Common Ancestor*), que é aquele que mais apresenta alinhamentos com o *k-mer* de entrada.

A segunda estratégia é baseada no programa Kaiju (Menzel, Ng, Krogh, 2016) com limiar de corte *e-value* inferior a $1 * 10^{-5}$, usando como referência o banco de dados RefSeq (Pruitt, Tatusova, Maglott, 2006) fornecido em conjunto com o programa. Dessa classificação foi gerada uma matriz de contagem no formato de leituras por táxon, que foram comparadas a nível de filo e gênero. O kaiju é um programa que realiza a classificação das leituras diretamente em um conjunto de dados de proteínas microbianas, o que gera uma maior sensibilidade na classificação, através de uma implementação da transformação do alinhador de Burrows-Wheeler para eficientemente encontrar o máximo de *matches* exatos, com ou sem *mismatches*. Para ambas as anotações foram excluídas as sequências anotadas como plantas (nível maior: divisão *Streptophyta*).

As matrizes com taxonomia e contagem gerada pelos dois programas foram importadas na plataforma *MicrobiomeAnalyst* (Dhariwal et al., 2017), para geração de análises de diversidade a partir de índices ecológicos, além de testes estatísticos. Nessa plataforma, foram filtrados *taxa* com menos de 4 leituras atribuídas para remoção de classificações espúrias, além daqueles de aparecimento exclusivo em uma única amostra, para que depois fossem feitos os cálculos de α e β diversidade.

Em uma segunda análise também no Microbiome Analyst, foram feitas comparações de táxons diferencialmente abundantes com DESeq2 (Love, Huber, Anders, 2014), transformando os dados para expressão log-relativa, com os mesmos filtros.

4.8 Comparação aos microbiomas de cana-de-açúcar públicos

A fim de correlacionar os microrganismos encontrados no presente trabalho com os já conhecidos da rizosfera de cana-de-açúcar, foram obtidas as sequências de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) de rizosfera do trabalho de Souza et al. (2016), que são baseadas em análise do gene 16S, e aqui denominadas de *microbioma fundamental* (MF), em inglês, *core microbiome*.

Neste estudo, os autores mostram que essas UTOs são prevalentes em diferentes estágios de desenvolvimento das plantas, e assim foram definidas como microrganismos fundamentais da planta, isto é, que sempre são selecionados para existência nesse ambiente. Reforçando que esses conjunto de microrganismos estão relacionados a *taxa* de promoção de crescimento ou processos fermentativos.

Para comparação entre *taxa* comum entre os dois ambientes, as sequências obtidas receberam predição taxonômica usando o programa SINTAX implementado no USEARCH11 (Edgar, 2010) contra o banco de dados de 16S *RDP Database* (Cole et

al., 2013), gerando uma matriz taxonômica até o nível de gênero. Esses *taxa* foram comparados com os gêneros descritos no presente trabalho.

4.9 Estimativa dos genes diferencialmente abundantes entre os manejos

O conjunto de leituras das amostras de ambos os manejos foram quantificadas em relação a montagem com o programa Kallisto (Schaeffer et al., 2017), que realiza pseudo-alinhamentos e atribui, para cada *contig*, uma quantia numérica que reflete o número de pseudo-alinhamentos possíveis para cada uma das amostras. Esse programa possui, ainda, um parâmetro de normalização baseado no tamanho do *contig*.

Como resultado, é gerada uma matriz de contagem, que foi importada no R com o programa *tximport* (Soneson, Love, Robinson, 2015). Ali, foi feita a avaliação dos genes diferencialmente abundantes utilizando o programa DESeq2 (Love, Huber, Anders, 2014).

O método do DESeq2 fornece um cálculo de proporções (FoldChange, ou L2FC) entre amostras utilizando um modelo linear generalizado sobre uma distribuição binomial negativa. Além disso, o método emprega uma transformação de normalização por biblioteca, o método de mediana das razões, a fim de evitar desequilíbrios causados pela profundidade de sequenciamento, o que também evita a necessidade de normalizações baseadas em corte, como a rarefação. A estratégia proposta acima é típica de análises de estudos de RNA-Seq, mas estão ganhando espaço na análise de conjuntos metagenômicos e metataxonômicos (Jonsson et al., 2016).

4.10 Análise dos termos associados aos genes diferencialmente abundantes

Para os genes selecionados a partir dos critérios utilizados de diferença de abundância, foram comparadas as prevalências de termos GO (Gene ontology), KEGG e número E.C. (Enzyme Commission Numbers), ressaltando-se aqueles mais abundantes com o programa STAMP (Parks et al., 2014) pelo teste *t* de Welch, que comparou as contagens colapsadas em torno desses termos, detectando, assim, aquelas contagens discrepantes para um ou outro manejo. Os ortólogos diferencialmente abundantes com anotações nas vias KEGG (Kanehisa et al., 2018) do benzoato (rota 00362), tolueno (rota 00623), nitrogênio (rota 00910) e enxofre (rota 00920) foram mapeados de acordo com seu *fold change*, para cada um dos manejos.

Após todas as descrições dos métodos de bioinformática, apresentamos um diagrama das análises para fácil visualização das etapas de processamento, e também dos pacotes, *pipelines* e programas que foram utilizados na análise, desde o pré-

Resultados e discussão

5.1 Descritivos numéricos de montagem e anotação

Na tabela 5.1, podemos observar os valores numéricos descritivos da montagem e anotação dos dados. Destacando valores do pré-processamento e pós-processamento, além dos números de leituras depois da anotação com o programa Kraken e Kaiju.

Tabela 5.1: Leituras de sequenciamento e métricas de anotação taxonômica. Número de leituras antes e após os processamentos de qualidade, e número de leituras anotadas por protocolo de análise taxonômica nos protocolos Kaiju e Kraken.

Descritivo	CRZ2	CRZ3	CRZ4	ORZ2	ORZ3	ORZ4
Pré-processamento	109.095.260	57.339.398	64.995.917	99.800.796	120.823.932	75.763.634
Pós-processamento	54.478.886	28.607.941	64.855.550	49.729.117	60.264.479	75.551.709
Anotadas com Kraken	21.905.334	11.545.979	27.038.330	22.473.262	25.794.935	31.087.033
Anotadas com Kaiju	9.026.327	5.208.971	11.367.653	9.665.079	11.358.825	13.573.528

Após salientar os valores das leituras para os processos de montagem e anotação. Chamamos atenção para a tabela 5.2, que possui valores descritivos a respeito da montagem e da anotação do metagênom.

5.2 Métricas: montagem e anotações (taxonômica e funcional).

A montagem do metagenoma de referência resultou em aproximadamente 15 milhões de *contigs*. Destes, 100 mil foram diferencialmente abundantes entre as amostras de manejo orgânico e convencional pela análise com o programa DESeq2 (p -valor < 0.05). Foram preditas aproximadamente 4,9 milhões de ORFs (Prokka), sendo 70% destas classificadas como hipotéticas, e 8% recebendo classificação de ortólogo pelo eggno-mapper. Por sua vez, a anotação taxonômica para as leituras realizadas pelo programa Kaiju, obteve 27% das leituras com atribuição taxonômica para bactérias, fungos e arqueias com base no banco de dados do RefSeq, enquanto que a anotação pelo Kraken com um conjunto mais abrangente de referências atribuiu taxonomia a até 45% das leituras por amostra.

Tabela 5.2: Métricas de montagem e quantitativos de anotação do metagenoma.

Descritivo	Contagem
Sequências contíguas	149.260.73
Maior sequência	612.79 p.b.
Contigs >1.000 p.b.	250.000
Contigs >10.000 p.b.	357
Tamanho médio de sequência contígua	425
N50	398
ORFs preditas (Prodigal)	4.923.879
Proteínas hipotéticas (Prokka)	3.471.472
Proteínas anotadas por mapeamento de ortólogos (eggno-mapper)	394.877
Proteínas com atribuição de ortólogo KEGG	224.762
Proteínas com atribuição de ontologia GO	110.981
Proteínas com atribuição de ortólogo COG	283.818
Proteínas com atribuição de EC number (Prokka)	577.277

5.3 Abundância funcional KEGG e GO

Para entendimento da relação funcional entre os manejos, buscamos delinear aquilo que está mais presente no solo do manejo orgânico (MO) em relação ao convencional (MC), que se deu por meio dos *contigs* diferencialmente abundantes.

Essas informações vêm a preencher a lacuna de conhecimento sobre o impacto desses manejo sobre a rizosfera da cana-de-açúcar, o que permitirá uma compreensão mais acurada da relação entre os dois manejos e suas influências na saúde da planta e meio ambiente. Os impactos mais importantes identificados pelo trabalho foram: a presença no manejo orgânico de mais genomas codificantes de enzimas nos ciclos de nitrogênio, enxofre e degradação de compostos complexos, além de uma seleção de gêneros microbianos, tanto bacterianos quanto fúngicos.

Na Figura 5.1. temos a análise de diferença entre proporções do termos KEGG (Kanehisa et al., 2018) pertencentes às diferentes rotas metabólicas classificadas por esse sistema, e isso fornece uma visão geral do comportamento diferencial das microbiotas. Aqui, é possível observar favorecendo o manejo convencional as rotas metabólicas de degradação de glicosaminoglicano ($p = 0.003$), chaperonas ($p = 0.008$), atividades no ribossomo ($p = 0.012$) e "Others"(99999, $p = 0.021$), que incluem enzimas (como fosfolipases) não atribuídas a nenhuma rota específica.

Em contrapartida, nas amostras obtidas no manejo orgânica observa-se maior abundância de termos relacionados a rotas de degradação de compostos como tolueno ($p = 0.011$), fluorobenzoato ($p = 0.015$), benzoato ($p = 0.026$) e de clorociclohexanos e clorobenzeno ($p = 0.027$) e "Others"(99998, $p = 0.025$), que incluem proteínas de bacteriófagos.

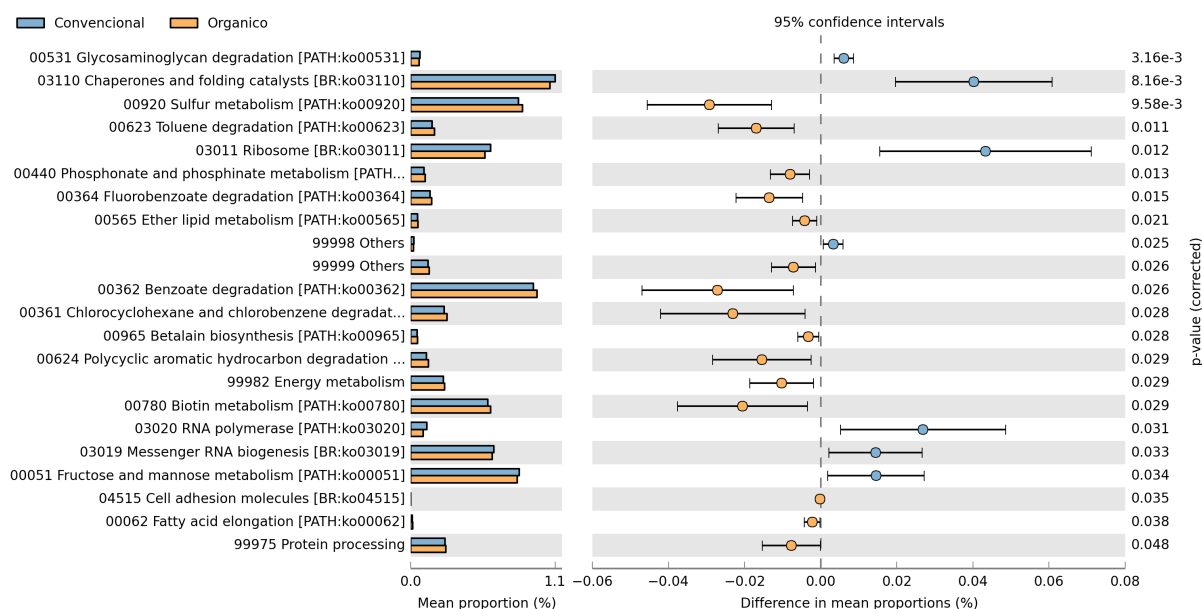


Figura 5.1: Visão geral de rotas metabólicas prevalentes entre manejos (KEGG). Exibida na unidade de diferença entre proporções (% das médias) para as rotas metabólicas do KEGG, a partir da atribuição de ortólogos aos *contigs* pelo programa Egnog-mapper. Médias foram comparadas pelo teste *t* de Welch, no programa STAMP.

Em relação a análise funcional dos ambientes, exploramos uma visão geral dos metabolismos afetados pelo manejo, através da abundância de contagens associadas a diferentes termos referentes às rotas metabólicas do KEGG, e assim, elencamos os principais achados.

Podemos observar ainda a abundância de contagens associada a termos pertencentes às rotas metabólicas no MO, como os metabolismos: *Toluene degradation*, *Benzoate degradation*, *Chlorocyclohexane and Chlorobenzene degradation*, *Polycyclic aromatic degradation* e *Fluorobenzene degradation*. Estes são encontrados em produtos químicos sintéticos, e devido a sua recalcitrância e potencial de bioacumulação, permanecem nos ambientes. Essa observação é o contrário do esperado, de que os genomas codificantes dessas enzimas deveriam estar mais abundantes no manejo convencional, que recebe deposições frequentes desses compostos (Singh et al., 2018).

Algumas outras rotas apresentaram diferença significativa observando uma maior ocorrência no manejo orgânico de genes que atuam nas rotas metabólicas, como degradação de glicosaminoglicanos (ligados à formação de mucopolissacarídeos (Wang et al., 2008)), biotina, e metabolismo fosfonato e fosfinato - os dois últimos ligados à quimiotaxia (Huang, Su, Xu, 2005; Renfro, 2013).

Em outra análise, de função molecular atribuída por termo GO, foram encon-

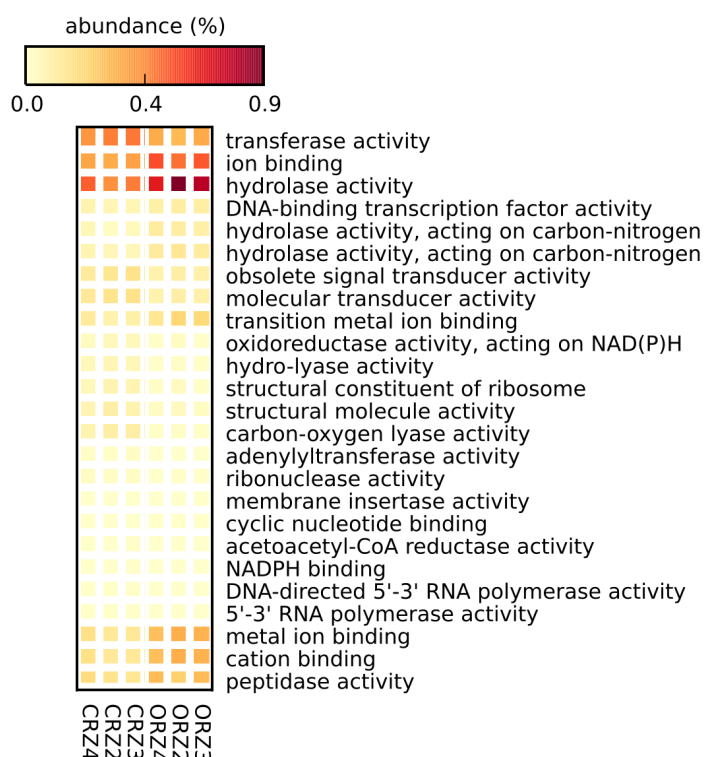


Figura 5.2: Funções moleculares (GO) em porções genômicas diferencialmente abundantes. Baseado no cálculo de diferencialmente abundantes para termos GO atribuídos às funções moleculares.

tradas algumas enzimas interessantes enriquecidas na rizosfera orgânica, como as hidrolases e as peptidases, (Figura 5.2).

No mapa de calor com funções moleculares, destaca grupos como *Hydrolase activity* e *Peptidase activity*, que aparecem diferencialmente abundantes (DA) para o MO. Bisht et al. (2015) indicam que as hidrolases conseguem atuar na rizorremediação dos hidrocarbonetos poliaromáticos através dos efeitos sinérgicos das plantas com as raízes e também devido ao favorecimento do crescimento da comunidade microbiana na superfície radicular, indicando que a abundância desta função pode estar relacionada com o aumento das atividades de degradação identificadas na (Figura 5.1) (Singh et al., 2018).

5.4 Prospecção de genes relacionados à promoção de crescimento e degradação de xenobióticos.

Os resultados das anotações de genes relacionados às rotas metabólicas do KEGG e número E.C., nos forneceu uma visão mais abrangente das vias mais predominantes, como o metabolismo de nitrogênio, tolueno e benzoato associados aos

Após a redução do nitrato e nitrito, o próximo composto é a amônia, que é forma imediata de nitrogênio disponível para a planta, sendo então a mesma incorporada ao aminoácido glutamato através da ação de duas enzimas. A primeira é realizada pela glutamina sintase e é considerada uma via facilitadora para a incorporação de nitrogênio inorgânico, e a segunda é o glutamato sintase. Ambos glutamina e glutamato sintase, são utilizados como doadores em processos do tipo: armazenamento, transporte e síntese de proteínas, além da formação de nucleotídeos para compor moléculas básicas de RNA e DNA (Lea, Miflin, 2018; Foyer, Zhang, 2011; Hirel, Lea, 2001; Hirel et al., 2011).

Além disso, observamos em detalhe na Figura 5.4 o surpreendente potencial para degradação de xenobióticos (tolueno e benzoato), também abundante no manejo orgânico, percebendo possíveis rotas para a mineralização completa desses compostos cíclicos.

A rota de degradação de benzoato e tolueno foram caracterizadas predominantemente por enzimas diferencialmente abundantes para o sistema de manejo orgânico. O conjunto de enzimas identificadas podem atuar na degradação do benzeno e tolueno, inclusive as etapas metabólicas até sua completa mineralização, estão exemplificadas na (Figura 5.4).

Na figura 5.4 podemos observar a combinação das rotas metabólicas do tolueno e benzoato, isso pode sugerir que a comunidade microbiana do tratamento orgânico possui porções genômicas diferencialmente abundantes associadas à aceleração da degradação desse compostos, chegando à mineralização completa, ou seja transformando-os em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade (inócuos), como dióxido de carbono e água (Andrade, Augusto, Jardim, 2010). Porém, não foi encontrado em literatura estudos relacionando degradação desses compostos tóxicos em manejos orgânicos.

Ainda assim, o estudo de Shaikh, Wani e Sayyed (2018) aponta que as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) é a alternativa mais aceitável para a biodegradação de xenobióticos (inseticidas, herbicidas e fertilizantes), devido à possibilidade de adsorverem esses compostos pela superfície da célula e os metabolizarem. Porém, esse conjunto de microrganismos apresentam um desempenho melhor de biodegradação em condições de laboratório, não conseguindo ainda fazer o mesmo no campo, pois as aplicações se tornaram bem regulares e as vezes em altas concentrações.

Também foram encontradas porções genômicas diferencialmente abundantes envolvidas no metabolismo do enxofre, alocadas na (Figura 5.5).

O metabolismo de enxofre (*Sulfur metabolism*), segundo Schmalenberger et al. (2008), o enxofre não é necessário só para as plantas, mas para todos os micror-

ganismos, particularmente para síntese dos aminoácidos cisteína e metionina. Além de possuir estudos envolvendo proteção contra o estresse oxidativo, propriedades quelantes contra metais pesados e a atuação de grupos de rizobactérias capazes de mineralizar organossulfurados, especialmente quando o sulfato inorgânico está em baixos níveis.

Vemos na figura 5.5 a abundância diferencial de porções genômicas associados a enzimas e genes que levam à produção de sulfato (*SuoX*, *CysP*, *CysU*, *CysA* e *CysQ*), por um processo de oxidação. A deficiência de enxofre em plantas leva a uma redução de produtividade e de sua qualidade, e é reconhecido que o processo de assimilação redutora leva a entrada do enxofre pelas raízes e assimilação como cisteína (Buchanan, Gruissem, Jones, 2015). Em nosso caso, esse caminho metabólico foi encontrado em maior proporção no manejo orgânico, o que sinaliza para um favorecimento da saúde das plantas associadas a rizosfera nesse sistema de manejo.

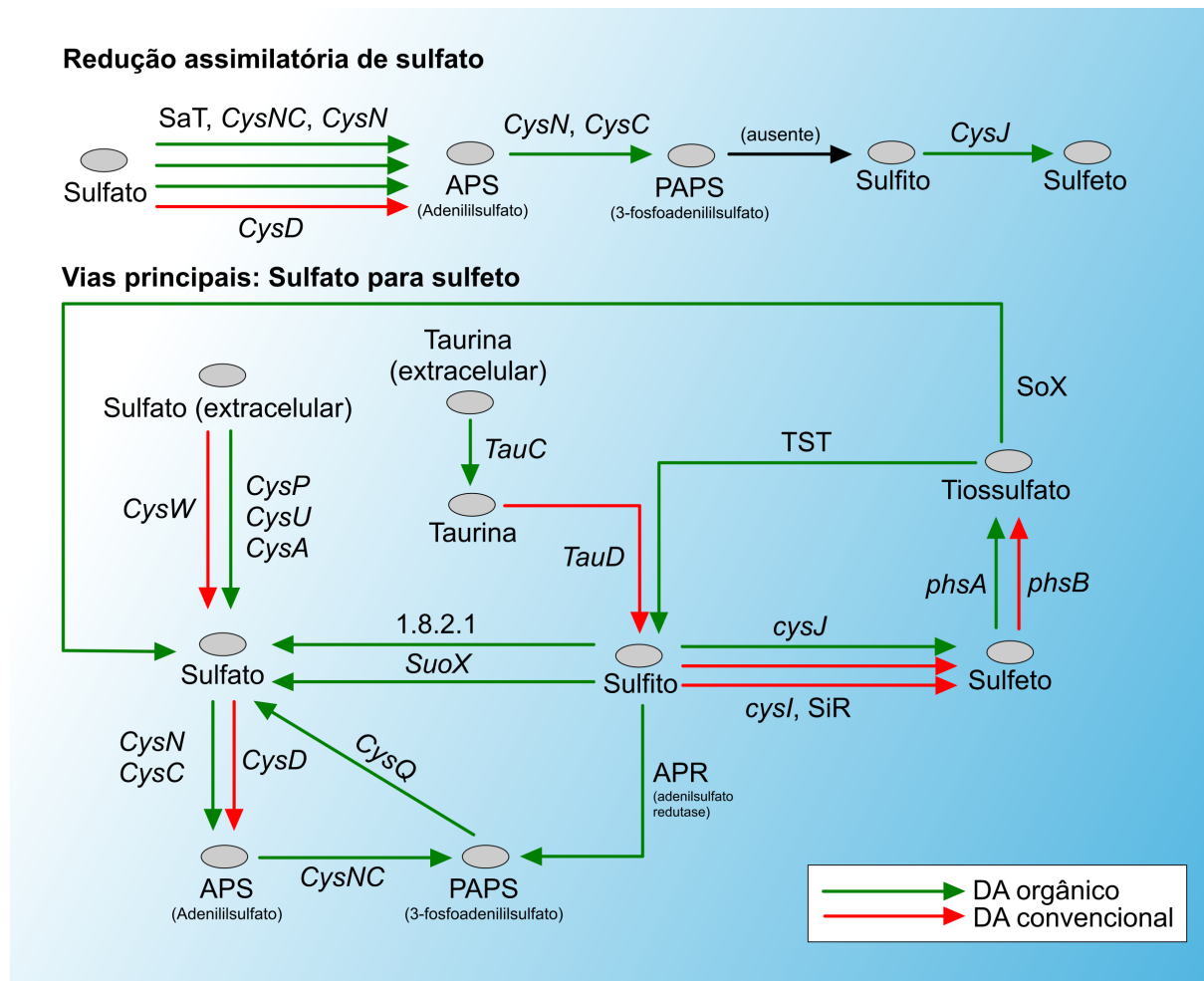


Figura 5.5: Metabolismo potencial diferencial de enxofre, baseado nas proteínas em porções genômicas diferencialmente abundantes, adaptado das rota 00920 do *KEGG Pathways*.

5.5 Abundância de genes de resistência a antibióticos (Resistoma)

Nas condições descritas, foram aceitos 414 alinhamentos em sequências contíguas com anotações em diversas classes de antibióticos. Destes, 20 estão em porções genômicas diferencialmente abundantes (Figura 5.6), indicando sua possível seleção pelo tipo de manejo para aquele organismo. Também estão expostas as predições taxonômicas dos microrganismos que portam esses elementos de resistência. (Tabela 5.3).

Várias porções atribuídas a resistência a antibióticos tiveram a predição taxonômica atribuída a *Bacillus megaterium* com o programa Kraken. Esse organismo é um conhecido promotor de crescimento em plantas e indutor de resistência, através principalmente de mecanismos de solubilização de fosfatos, de ferro e produção de ácido indol-acético (Chakraborty, Chakraborty, Basnet, 2006), o que pode ser interes-

sante para o desenvolvimento da rizosfera, mas desinteressante para o ambiente, pois é conhecido que genes de resistência podem ser disseminados no ambiente através da transmissão horizontal às outras bactérias (Wintersdorff et al., 2016) e intensificar a resistência aos antibióticos conhecidos.

Na figura 5.6. são destacados algumas classes de elementos de resistência a antibióticos, que atualmente é considerada uma das ameaças mais graves a saúde humana (Sommer, Dantas, Church, 2009). O uso desequilibrado de antibióticos, tanto para tratamentos de humanos quanto de animais é a principal ação seletiva para o surgimento e disseminação de resistência a antibióticos (Smillie et al., 2011). Os patógenos resistentes a antibióticos ocorrem com alta regularidade em contextos clínicos, não obstante agora também estão sendo encontrados em solos, corpos de água e fezes de animais (Forsberg et al., 2012; Zhu et al., 2013; Su et al., 2017).

Uma das classes de elementos de resistência a antibióticos são os genes de resistência às fluoroquinolonas que estão presentes tanto no manejo orgânico quanto no convencional, sendo válido lembrar que esse grupo é usado tanto para tratamentos na pecuária (animais em geral) quanto em seres humanos (Rosendahl et al., 2012; Su et al., 2017).

Segundo os estudos de Rosendahl et al. (2012), o grupo das fluoroquinolonas são persistentes e acessíveis no solo, devido a sua baixa degradabilidade. Estes anteriores apontam também que a presença desse grupo no solo pode afetar a rotatividade dos nitrogênio no solo (potencial nitrificação e desnitrificação).

Um outro grupo são os lipopeptídeos, que aparecem diferencialmente abundante no manejo convencional. Essa classe de antibiótico está relacionada com a ação antifúngica, sendo produzida na rizosfera por microrganismos e diversos estudos indicam que podem usados como biocontroles (Cawoy et al., 2015; Arbi et al., 2016; Chen et al., 2017b)

Um outro elemento de resistência que foi encontrado, porém diferencialmente abundante no solo orgânico são os genes de resistência a elfamicinas, produzidas exclusivamente pelo filo das *Actinobacterias*, é um metabólito secundário e pode atuar como um antimicrobiano, antitumor e/ou antiviral atuando contra microrganismos patogênicos (Pandey et al., 2018).

5.6 Diversidade microbiana entre manejos - análise taxonômica.

Para entender as relações de diversidade microbiana entre os manejos, buscamos destacar aquilo que está mais abundante no solo do manejo orgânico (MO) em relação ao convencional (MC), ou o contrário, utilizando da análise de matrizes taxonômicas baseada na classificação das leituras (sem montagem), que apesar de

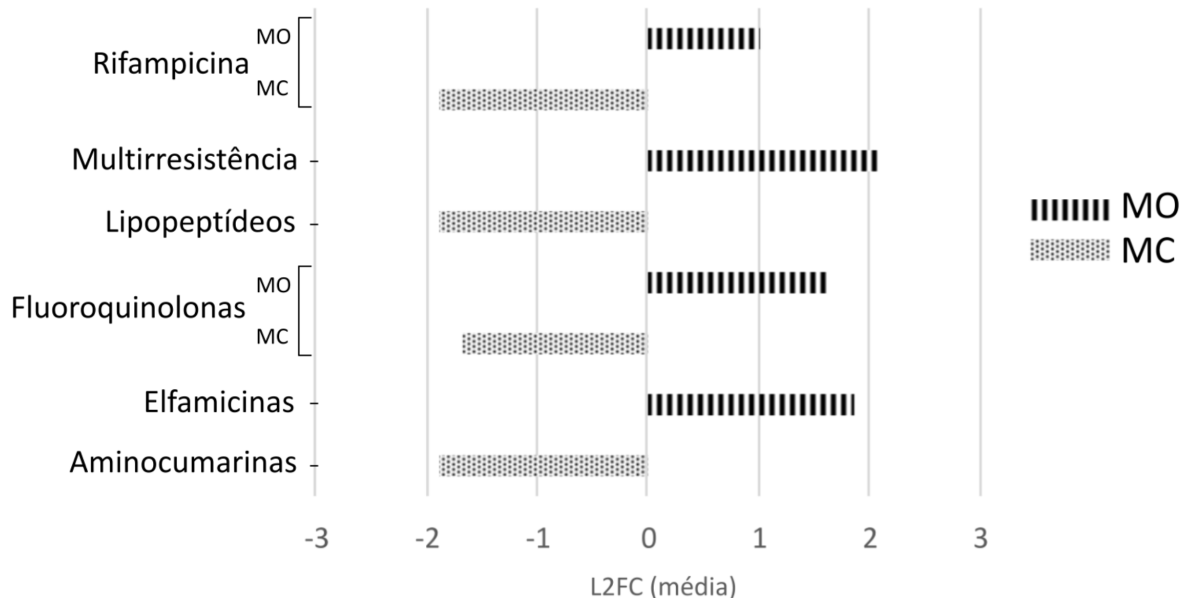


Figura 5.6: Classes de elementos de resistência a antibióticos diferencialmente abundantes entre os manejos.

Tabela 5.3: Taxonomia atribuída aos elementos de resistoma. Para cada elemento, há um L2FC calculado pelo DESeq2, e a classe atribuída ao elemento de resistoma detectado.

ID (contig)	Taxonomia (Kraken)	L2FC	Classe
k127_10128801	<i>Bacillus megaterium</i>	-1.59	Aminocumarinas
k127_2861332	<i>Bacillus megaterium</i>	-2.12	Aminocumarinas
k127_8480302	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22	-1.96	Aminocumarinas
k127_14791096	<i>Flavisolibacter tropicus</i>	1.40	Elfamicinas
k127_5334579	<i>Tistlia consotensis</i>	2.64	Elfamicinas
k127_9662563	<i>Terracidiphilus gabretensis</i>	1.59	Elfamicinas
k127_10766896	<i>Burkholderia ubonensis</i>	-1.87	Fluoroquinolonas
k127_12453355	<i>Bacillus megaterium</i>	-1.49	Fluoroquinolonas
k127_14483078	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i>	1.46	Fluoroquinolonas
k127_511983	<i>Burkholderia</i> sp. YR520	1.91	Fluoroquinolonas
k127_6256849	u.c.: <i>Burkholderiaceae</i>	1.54	Fluoroquinolonas
k127_7843971	<i>Bacillus</i> sp.	-1.86	Lipopeptídeos
k127_9536138	<i>Bacillus megaterium</i>	-1.90	Lipopeptídeos
k127_10334917	<i>Rhizobium jaguaris</i>	2.23	Multirresistência
k127_5209043	<i>Pseudomonas</i> sp. 286	1.93	Multirresistência
k127_10284009	<i>Bacillus aryabhattai</i>	-1.74	Rifampicina
k127_10645663	<i>Bradyrhizobium</i> sp. URHA0002	1.03	Rifampicina
k127_11239443	<i>Bacillus</i> sp.	-1.81	Rifampicina
k127_13028758	u.c.: <i>Alfaproteobacteria</i>	-1.62	Rifampicina
k127_14028565	<i>Burkholderia</i> sp. OK233	-2.32	Rifampicina

u.c.: último nível taxonômico classificável

possuírem menor sinal filogenético devido ao menor tamanho, evitam também os ruídos originados de montadores e quantificadores. A distribuição geral de filos e gêneros microbianos pode ser vista na (Figura 5.7).

Os principais filos e gêneros atribuídos pelo programa Kraken podem ser observados na figura 5.7, que revela uma predominância de proteobactérias, em especial *Bradyrhizobium* e *Sphingomonas*. Entre bactérias, arqueias e fungos, foram anotados 2.350 organismos a nível de gênero, considerando somente aqueles com ao menos 04 leituras atribuídas (filtro para remoção de possíveis atribuições espúrias), o que revela uma intensa diversidade de microrganismos presentes.

Uma das primeiras análises feitas para responder as questões sobre a diversidade dos grupos foi a α -diversidade, que foi analisada por diversos índices como ACE, Chao1, gêneros observados e índice de Shannon, exposto na (Tabela 5.4). Além da obtenção das médias dos índices de alfa-diversidade, foi realizado o teste de Mann-Whitney para determinar diferenças entre médias para os tratamentos, não detectando diferenças exceto para a diversidade de fungos, pelo índice de Shannon, apesar de uma diferença muito pequena (0,08 unidades). Essas informações revelam que, a nível global, as comunidades microbianas são igualmente diversas, indicando que seria necessário analisar as diferenças para cada grupo em particular.

Tabela 5.4: Média dos índices de alfa-diversidade para bactérias, fungos e arqueias para os dois manejos, com base na anotação das leituras e contagem com o programa Kraken.

Organismo	Bactérias		Arqueias		Fungos	
Manejo	MC	MO	MC	MO	MC	MO
ACE	20817,76	20859,57	704,10	709,22	701,75	709,68
Chao1	20850,79	20883,44	704,76	709,21	704,78	704,39
Observada	20689,00	20735,33	693,33	699,67	680,33	685,33
Shannon	8,22	8,26	5,72	5,62	* 5,51	* 5,59

(*) Significativo pelo teste de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis

Observamos também, pelo NMDS de beta-diversidade Bray-Curtis da Figura 5.8, que é impossível ver uma distinção clara das amostras réplicas representativas dos dois sistemas de manejo, considerando as comunidades de bactéria e archaea. Como essa figura captura os taxa de variância mais acentuada no ambiente, a ausência de separação por tratamento tanto para bactéria quanto para archaea indica que os maiores indicadores dessas comunidades possuem baixa variância entre si, não sendo detectadas mudanças drásticas baseadas no sistema de manejo. Esse não foi o caso para as comunidades fúngicas, que foram distintas pela mesma métrica de escalonamento e mesmo índice de beta-diversidade, indicando uma seleção mais intensa de fungos.

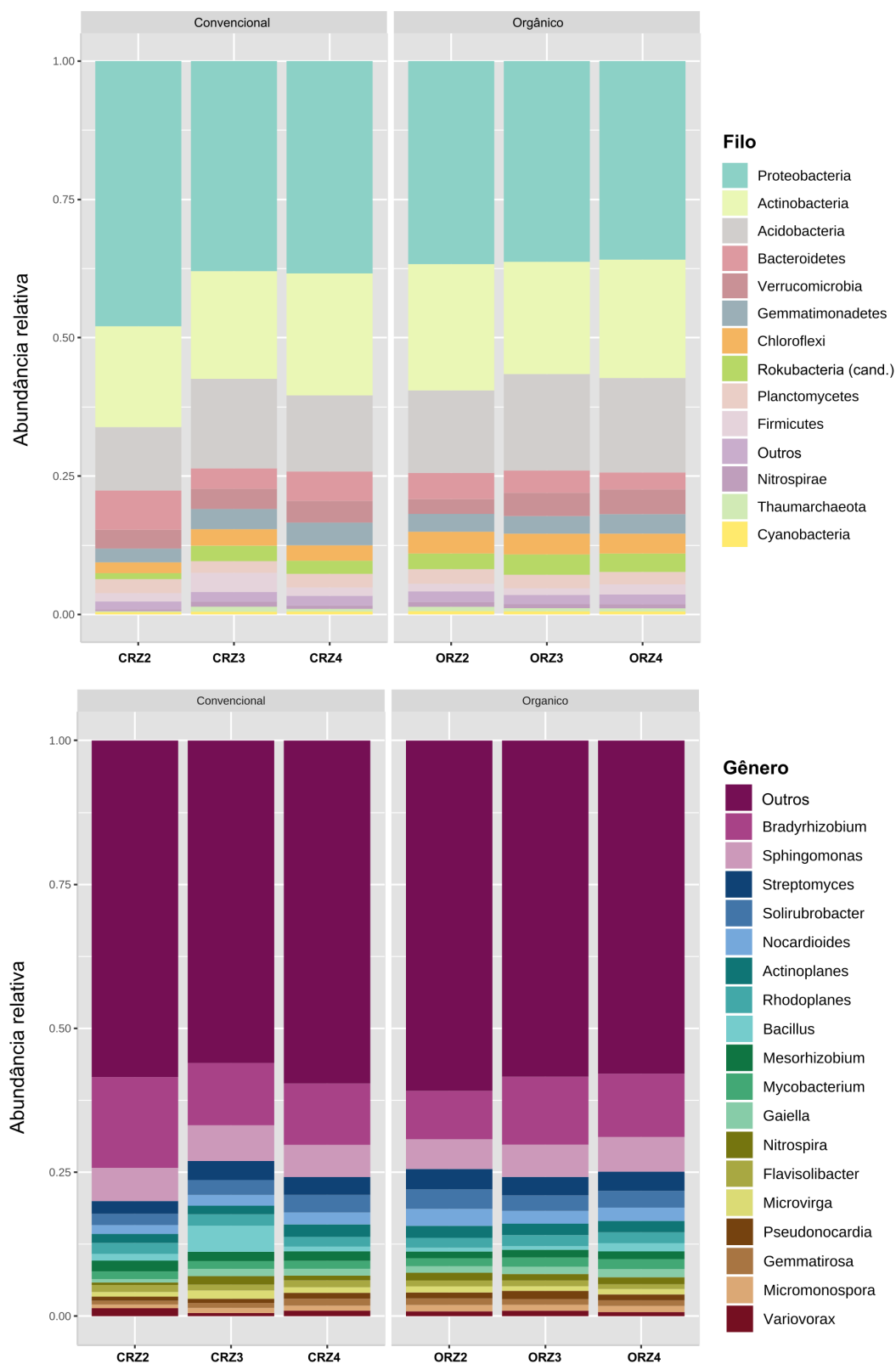


Figura 5.7: Distribuição de bactérias a nível de filo e gênero. Figuras exportadas do Microbiome Analyst, exibidas em porcentagem do total da comunidade.

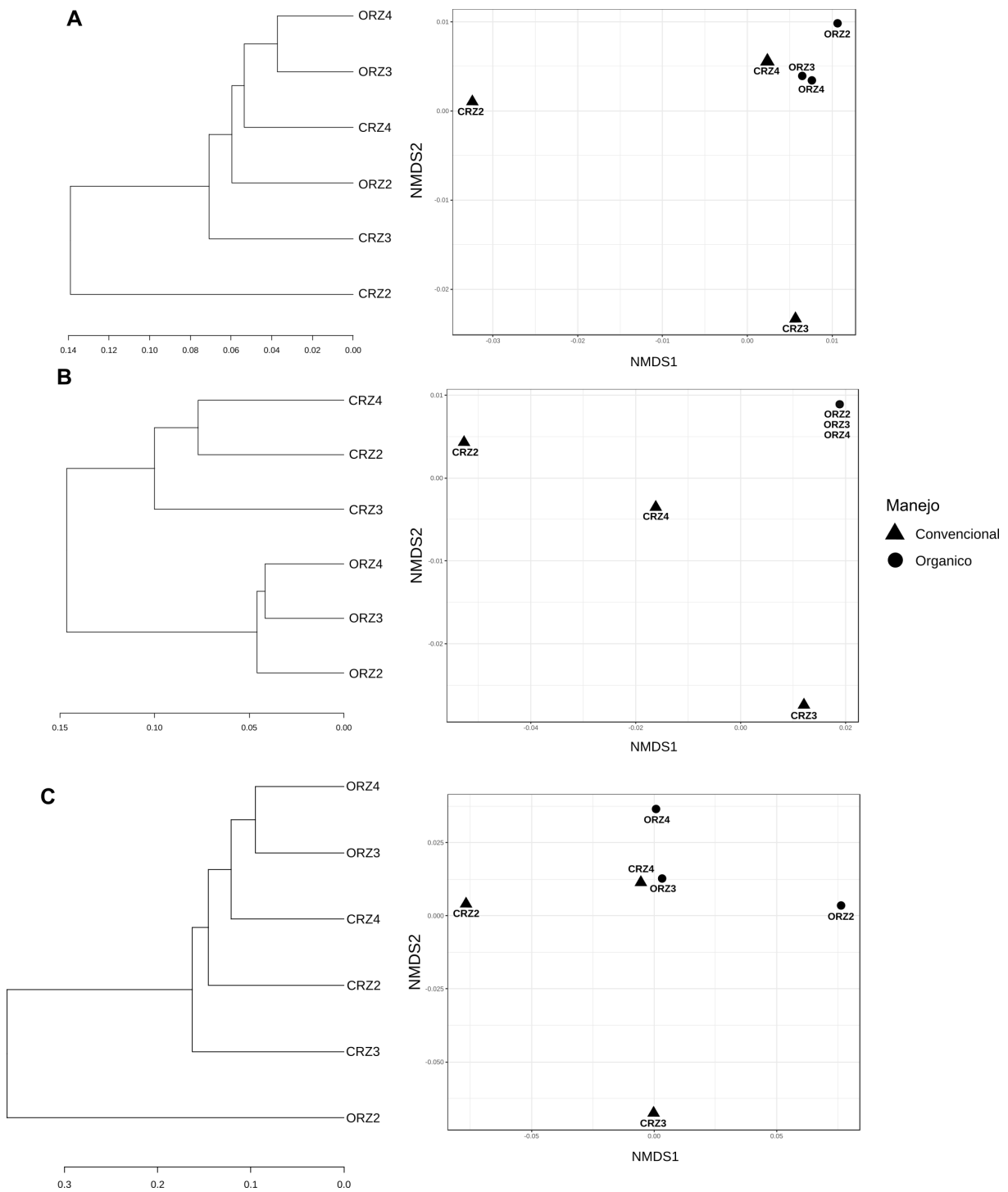


Figura 5.8: Comparação das comunidades microbianas pela diversidade β . Agrupamento pelo método de Ward e escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) do índice Bray-Curtis de β -diversidade das bactérias (A), fungos (B) e arqueias (C) em MC e MO.

Nesse âmbito, foram detectados dois gêneros fúngicos DAs no manejo convencional, *Fusarium* e *Resinicium*, o que indica maior efeito do manejo nesses organismos.

Verificamos também por um segundo método, o de agrupamento pelo método de Ward do índice Bray-Curtis também na figura 5.8, que há uma mistura de amostras réplicas dos dois manejos dentro dos agrupamentos bactérias e arqueias, o que também não é o caso para fungos, que formaram entre si dois agrupamentos distintos cada qual com as réplicas representativas dos dois sistemas de manejo (MO e MC).

A Figura 5.9 exibe os gêneros diferencialmente abundantes pelo cálculo do DESeq2, apenas aqueles com p-valor ajustado menor que 0.05 para o teste de correção de falsos positivos realizado no teste de Benjamini-Hochberg, tanto para a anotação do Kaiju, quanto para a anotação do Kraken, totalizando 23 gêneros DA entre os manejos em ao menos um método de anotação.

Na Figura 5.9 foram exibidos os gêneros microbianos DAs entre os tratamentos, então colocamos em contexto a possível justificativa para esse fenômeno relativo as bactérias *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Leifsonia* e *Dyella*, e os fungos *Fusarium* e *Resinicium*.

Nitrosovibrio foi uma bactéria mais prevalente (DA) no manejo convencional pertencente a subclasse β -proteobactéria, e está associado ao primeiro passo da nitrificação, realizando a oxidação da amônia a nitrito, devido a isso recebem o nome de bactérias oxidantes de amônia (*ammonia-oxidizing bacteria*), outra característica desse gênero é que seus membros vivem em ambientes oligotróficos, o que significa com baixa disponibilidade de nutrientes (Soliman, Eldyasti, 2018; Koops, Pommerening-Röser, 2015).

Outro gênero que está mais abundante no tratamento convencional é *Nitrospira*, que é o grupo mais diverso de bactérias oxidantes de nitrito (*nitrite-oxidizing bacteria* (NOB)), esse sucesso está correlacionado ao fato da *Nitrospira* ter sido associada a uma via econômica para oxidação do nitrito, e uma multifuncionalidade metabólica, conseguindo utilizar diferentes compostos orgânicos além do nitrito e CO₂, degradando citrato e ureia junto dos microrganismos oxidantes de amônia e realizando a oxidação de hidrogênio (Daims et al., 2015; Lücker et al., 2010).

Mais um gênero que foi diferencialmente abundantes para o manejo convencional, é a *Leifsonia*. Segundo Monteiro-Vitorello et al. (2004), o gênero *Leifsonia* possui papel patogênico para a cana-de-açúcar, causando raquitismo na planta. Ressaltando que o patógeno não parece ser transmitido pelo solo, e sim por meio do contato com a seiva de plantas contaminadas durante a colheita com facas e máquinas (Magarey et al., 2002).

Ainda sobre *Leifsonia*, estudos apontam que quando a espécie *Leifsonia xyli*

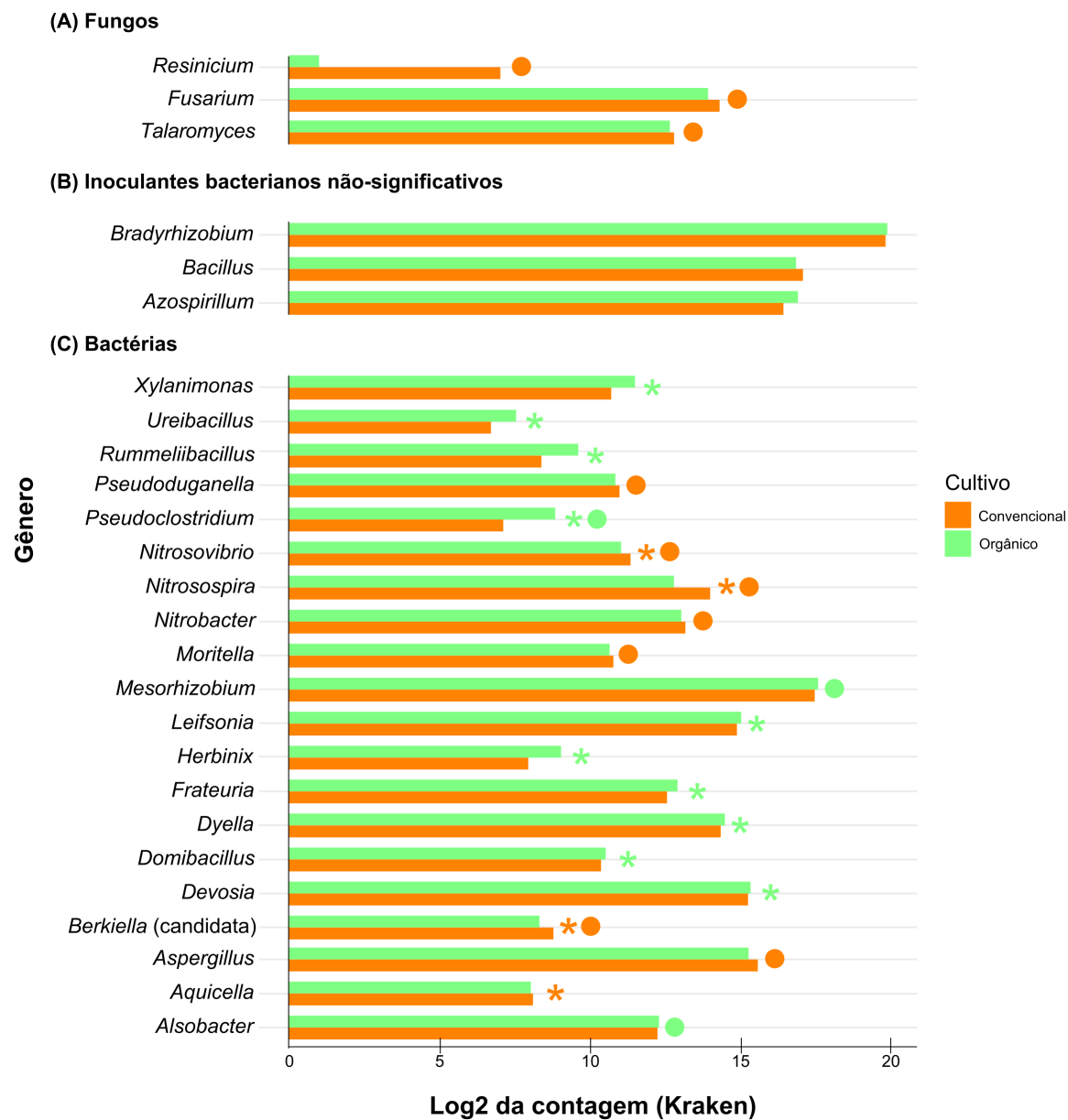


Figura 5.9: Abundância diferencial de gêneros microbianos. (*) DA pela anotação do Kaiju, (●) DA pela anotação do Kraken.

subsp. *cynodontis* é modificada geneticamente juntamente de outras bactérias endofíticas e inoculadas no xilema do milho, é conferida à planta um aumento na resistência contra doenças e insetos-praga, por meio da IRS. Também foi identificado que uma congênere, *Leifsonia soli* sp. nov, é capaz de produzir um metabólito de extremo interesse agropecuário, o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC desaminase) que ajuda na promoção de crescimento da planta (Madhaiyan et al., 2010) pela modulação do metabolismo de etileno. Foram encontradas, por fim, evidências que o gênero conseguiu modular o metabolismo de giberelina inata e do ácido-3-indol acético em ambientes com altas concentrações de cobre. (Kang et al., 2017).

O gênero *Dyella* também é diferencialmente abundante para o tratamento convencional é reportado que esse gênero possui atividade de biocontrole e rizopromotor de crescimento de plantas, combinado com outro microrganismo *Bacillus subtilis* (You et al., 2016). Os membros do gênero *Dyella* na sua maioria foram isolado do solo ou rizosfera e podem exercer um papel significativo na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos (Chen et al., 2017a; Hou et al., 2018).

Um gênero que aparece como DA no MC, foi o *Fusarium*. Segundo Manici, Caputo e Saccà (2017) esse gênero pode ser responsável pela redução do crescimento de plantas devido a uma série de metabólitos tóxicos incluindo ácido fusárico, enniatinas e equisetinas.

Outro gênero de fungo que aparece DA no MC, é o *Resinicium*, que segundo (Hamonts et al., 2018a) é reportado como um integrante do microbiota fundamental (MF) da cana, sugerindo sua alta capacidade de viver nos tecidos da planta. Esse gênero, que pertence ao filo *Basidiomycota*, também possui atividade antagônica contra outros microrganismos, o que o torna interessante para a aplicação no controle biológico (Paungfoo-Lonhienne et al., 2015).

Para atribuição taxonômica, inicialmente foi feito a atribuição com o programa Kaiju, que realiza anotação baseada nas proteínas do banco de dados *RefSeq*, ocorrendo a anotação até 20% das leituras. Para complementação da anotação foi feita uma segunda atribuição com o programa Kraken, que para todos os conjuntos de leituras mais que dobrou o número de sequências anotadas. Por possuírem algoritmos diferentes de atribuição taxonômica, as matrizes dos dois programas foram testadas pelo DESeq2 implementado no MicrobiomeAnalyst, o que gerou uma anotação mais complexa pelos dois casos possíveis: a identificação de *taxa* que não foi encontrada por um dos programas, ou a sobreposição de observações (DA em ambos), o que permitiu um maior poder de conhecimento da taxonomia do ambiente, e assim, uma análise mais completa da diversidade local.

É curioso observar também que, no manejo orgânico, houve a aplicação direta

de bioinoculantes baseados em microrganismos do gênero *Azospirillum*, *Bacillus* e *Bradyrhizobium*. Estes foram detectados na análise, mas não apresentaram diferença suficiente nas contagens para serem declarados diferencialmente abundantes entre as rizosferas dos manejos. Isto indica que a aplicação desses organismos através de bioinoculantes pode levar uma alteração populacional de duração limitada, retornando a um nível populacional normal na comunidade após um período de adaptação e crescimento, pois foram feitas muito tempo antes das amostragens.

5.7 Prospeção de táxons e diversidade comum entre microbiomas de cana-de-açúcar.

Uma análise adicional que realizamos foi cruzar nossa anotação a nível de gênero com aquelas do *core microbiome* de Souza et al. (2016). Assim 136 gêneros foram encontrados em comum, sendo que 05 dos nossos gêneros são diferencialmente abundantes no manejo convencional (p -ajustado < 0.05): *Aquicella*, *Dyella*, *Rhizomicrobium*, *Leifsonia* e *Devosia*. Destes, apenas *Leifsonia* não havia sido encontrada na rizosfera da cana-de-açúcar por aquele estudo. De todos os gêneros detectados aqui, 54 não foram encontrados na rizosfera do MF.

O fato da rizosfera apresentar microrganismos compartilhados com o MF de Souza et al. (2016) mostra que, apesar de haver uma porção muito favorecida pela cana-de-açúcar (os microrganismos em comum), existe também uma porção deles que será selecionada pelo tipo de manejo ou de outros fatores não-analisados, realçando a dificuldade em se determinar um verdadeiro microbioma ubíquo para a cana-de-açúcar. A maior parte dos microrganismos encontrados comuns ao MF teve sua riqueza inclinada ao manejo convencional, especialmente os gêneros *Leifsonia*, *Aquicella*, *Devosia* e *Dyella*.

Adicionalmente, Armanhi et al. (2018) descreveram uma comunidade sintética obtida da cana-de-açúcar capaz de promover crescimento através de uma técnica baseada em cultura - todos os gêneros descritos nessa comunidade foram encontrados sem diferença significativa entre os tratamentos, exceto por *Dyella* (L2FC = -0.97), o que indica o potencial para bioprospeção de microrganismos promotores de crescimento em ambos os manejos.

Análises da rizosfera de cana-de-açúcar em outras condições poderão reforçar ainda mais o conjunto de microrganismos fundamentais à planta, permitindo a modulação do microbioma mais interessante em termos de ganhos na planta através da aplicação de tratamentos, além de aumentar a precisão na determinação do MF da cana-de-açúcar, e do microbioma satélite, isto é, aquele que ocorre além do fundamental.

Conclusões

A partir da comparação entre os metagenomas nos dois ambientes, geramos uma avaliação primária do impacto diferencial dos manejos, especialmente se tratando de funções metabólicas em potencial, como: nitrogênio, enxofre e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e também fomos capazes de revelar as sutis diferenças em diversidade microbiana a partir da análise quantitativa baseada na atribuição de taxonomia, revelando que o manejo orgânico realiza a seleção de diversas porções genômicas de interesse agrônômico que poderão ser confirmados por uma análise complementar dos RNAs ambientais (metatranscritômica), que revelará de fato a expressão do metabolismo diferencial dos microrganismos detectados nesses ambientes.

As descobertas do presente trabalho avançam o conhecimento sobre esse microambiente, e colaboram com a elucidação de mecanismos de interesse tanto para a microbiologia clássica, revelando o potencial não-explorado de microrganismos cultivados e não-cultivados selecionados pelo sistema de cultivo em sua modulação por ação antrópica.

Os achados do trabalho podem ser usados, ainda, na concepção de tecnologias para a aplicação em campo, através de sistemas de intervenção como por bioinoculantes que podem ser pensadas e desenvolvidas a partir das informações encontradas, ou ainda transplante de solo para transferência da microbiota e assim, impacto na biorremediação e promoção de crescimento de cana-de-açúcar, seja em manejo orgânico ou convencional. Também pode contribuir para estudos com isolamento de microrganismos, para tentar desvendar as relações e comportamento da comunidade em distintos manejos.

O avanço dos estudos do microbioma no manejo orgânico incentiva, por fim, o desenvolvimento de tecnologias que permitam a alta produtividade em campo enquanto promove, simultaneamente, a redução sistemática da aplicação de compostos sintéticos que, apesar de cumprirem seu papel num planejamento de manejo integrado, são altamente danosos e prejudiciais ao ambiente, gerando hoje e no futuro problemas de saúde pública - aqui, sugerimos que há um longo caminho para alcançar a substituição total desses compostos.

Reforçando a importância dos estudos com a microbiota para saber como ela realmente pode influenciar a rizosfera e como isso pode afetar a produtividade. Com isso poderá direcionar tratamentos para o solo e manejos mais eficientes, ou mesmo desenvolvimento de formulações adequadas que possam auxiliar o desenvolvimento de uma agricultura orgânica tão produtiva quanto a convencional.

Referências bibliográficas

Ahemad M, Kibret M (2014), Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective, **Journal of King Saud University**, Elsevier, 26:1–20.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990), Basic local alignment search tool, **Journal of molecular biology**, Elsevier, 215:403–410.

Alvarez TM, Paiva JH, Ruiz DM, Cairo JPL, Pereira IO, Paixão DA, Almeida RF de, Tonoli CC, Ruller R, Santos CR et al. (2013), Structure and function of a novel cellulase 5 from sugarcane soil metagenome, **PloS One**, Public Library of Science, 8:e83635.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MH de, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F et al. (1981), Sequence and organization of the human mitochondrial genome, **Nature**, Nature Publishing Group, 290:457.

Andrade JdA, Augusto F, Jardim ICSF (2010), Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, **Eclética química**, SciELO Brasil, 35:17–43.

Andrews S (2010), FastQC, **A quality control tool for high throughput sequence data**, 370.

Aparna K, Pasha M, Rao D, Krishnaraj P (2014), Organic amendments as ecosystem engineers: microbial, biochemical and genomic evidence of soil health improvement in a tropical arid zone field site, **Ecological engineering**, Elsevier, 71:268–277.

Arbi A E, Rochex A, Chataigné G, Béchet M, Lecouturier D, Arnault S, Gharsallah N, Jacques P (2016), The Tunisian oasis ecosystem is a source of antagonistic *Bacillus* spp. producing diverse antifungal lipopeptides, **Research in microbiology**, Elsevier, 167:46–57.

Armanhi JSL, Souza RSC de, Damasceno NdB, Araújo LM de, Imperial J, Arruda P (2018), A Community-Based Culture Collection for Targeting Novel Plant Growth-Promoting Bacteria from the Sugarcane Microbiome, **Frontiers in plant science**, Frontiers, 8:2191.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006), The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms, **Annu. Rev. Plant Biol.**, Annual Reviews, 57:233–266.

Bakker PA, Berendsen RL, Doornbos RF, Wittermans PC, Pieterse CM (2013), The rhizosphere revisited: root microbiomics, **Frontiers in plant science**, Frontiers, 4:165.

Bakker PA, Doornbos RF, Zamioudis C, Berendsen RL, Pieterse CM (2013), Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome, **The plant pathology journal**, The Korean Society of Plant Pathology, 29:136.

Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA (2012), The rhizosphere microbiome and plant health, **Trends in plant science**, Elsevier, 17:478–486.

Berg G, Köberl M, Rybakova D, Müller H, Grosch R, Smalla K (2017), Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends, **FEMS microbiology ecology**, Oxford University Press, 93.

Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P, Sime-Ngando T. **Environmental microbiology: fundamentals and applications**. Dordrecht: Springer.

Bharadwaj A. Bioremediation of Xenobiotics: An Eco-friendly Cleanup Approach. In: **Green Chemistry in Environmental Sustainability and Chemical Education**. Nova Delhi: Springer. : 1–13.

Bisht S, Pandey P, Bhargava B, Sharma S, Kumar V, Sharma KD (2015), Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology, **Brazilian Journal of Microbiology**, SciELO Brasil, 46:7–21.

Bndes/cgee. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Brasília,. 1-75 :.

Braga LP, Yoshiura CA, Borges CD, Horn MA, Brown GG, Drake HL, Tsai SM (2016), Disentangling the influence of earthworms in sugarcane rhizosphere, **Scientific reports**, Nature Publishing Group, 6:38923.

Brasil (2003), Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências, **Diário Oficial da União**.

Brasil. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-açúcar, V5 - safra 2018/2019 primeiro levantamento**. Brasília, DF. 66 :.

Breitwieser FP, Lu J, Salzberg SL (2017), A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly, **Briefings in bioinformatics**.

Brimecombe MJ, Leij F D, Lynch JM (2007), Rhizodeposition and microbial populations, **The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. CRC Press, Boca Raton, Florida:73–109.

Bruto M, Prigent-Combaret C, Muller D, Moënne-Loccoz Y (2014), Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria, **Scientific reports**, Nature Publishing Group, 4:6261.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. **Biochemistry and molecular biology of plants**. West Sussex: John Wiley & Sons.

Buffalo V. **Bioinformatics data skills: Reproducible and robust research with open source tools**. Sebastopol: "O'Reilly Media, Inc."

Caldwell AC, Silva LCF, Silva CC da, Ouverney CC (2015), Prokaryotic diversity in the rhizosphere of organic, intensive, and transitional coffee farms in Brazil, **PloS one**, Public Library of Science, 10:e0106355.

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009), BLAST+: architecture and applications, **BMC bioinformatics**, BioMed Central, 10:421.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R (2011), Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample, **Proceedings of the national academy of sciences**, National Acad Sciences, 108:4516–4522.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M et al. (2012), Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms, **The ISME journal**, Nature Publishing Group, 6:1621.

Cawoy H, Debois D, Franzil L, Pauw E D, Thonart P, Ongena M (2015), Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/amyoliquefaciens, **Microbial biotechnology**, Wiley Online Library, 8:281–295.

Chakraborty U, Chakraborty B, Basnet M (2006), Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*, **Journal of basic microbiology**, Wiley Online Library, 46:186–195.

Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Galvan A, Fernandez E (2017), Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis, **Trends in plant science**, Elsevier, 22:163–174.

Champagne ET, Bett-Garber KL, Grimm CC, McClung AM (2007), Effects of organic fertility management on physicochemical properties and sensory quality of diverse rice cultivars, **Cereal chemistry**, Wiley Online Library, 84:320–327.

Chaparro JM, Sheflin AM, Manter DK, Vivanco JM (2012), Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility, **Biology and Fertility of Soils**, Springer, 48:489–499.

Chen K, Pachter L (2005), Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities, **PLoS computational biology**, Public Library of Science, 1, : e24.

Chen Mh, Xia F, Lv Yy, Zhou Xy, Qiu Lh (2017), *Dyella acidisoli* sp. nov., *D. flagellata* sp. nov. and *D. nitratireducens* sp. nov., isolated from forest soil, **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Microbiology Society, 67:736–743.

Chen Q, Liu B, Wang J, Che J, Liu G, Guan X (2017), Antifungal lipopeptides produced by *Bacillus* sp. FJAT-14262 isolated from rhizosphere soil of the medicinal plant *Anoectochilus roxburghii*, **Applied biochemistry and biotechnology**, Springer, 182:155–167.

Chen QL, Cui HL, Su JQ, Penueles J, Zhu YG (2019), Antibiotic resistomes in plant microbiomes, **Trends in plant science**, Elsevier.

Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM (2013), Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis, **Nucleic acids research**, Oxford University Press, 42:D633–D642.

Colombo LT, Oliveira MNV de, Carneiro DG, Souza RA de, Alvim MCT, Santos JC dos, Silva CC da, Vidigal PMP, Silveira WB da, Passos FML (2016), Applying functional metagenomics to search for novel lignocellulosic enzymes in a microbial consortium derived from a thermophilic composting phase of sugarcane bagasse and cow manure, **Antonie van Leeuwenhoek**, Springer, 109:1217–1233.

Commission E (2008), Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control, **Official Journal of the European Union**, 250:1–84.

Commission of the European Communities (2010), Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control., **Official Journal of the European Communities**, NA, 51:1–84.

Connor DJ (2018), Organic agriculture and food security: a decade of unreason finally implodes, **Field Crops Research**, Elsevier, 225:128–129.

Council NR et al. **The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet**. Washington, DC: National Academies Press.

Cui E, Wu Y, Zuo Y, Chen H (2016), Effect of different biochars on antibiotic resistance genes and bacterial community during chicken manure composting, **Bioresource technology**, Elsevier, 203:11–17.

Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A et al. (2015), Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria, **Nature**, Nature Publishing Group, 528:504.

Daniel R (2005), The metagenomics of soil, **Nature reviews microbiology**, Nature Publishing Group, 3:470.

DBO P. **Produtor tem custo até 40% menor com soja orgânica, relato do produtor quando da aquisição da certificação orgânica.** (http://ibd.com.br/pt/NoticiasDetalhes.aspx?id_conteudo=352/). [Online; Acesso em 16 de abril de 2019].

Desai C, Pathak H, Madamwar D (2010), Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites, **Bioresource Technology**, Elsevier, 101:1558–1569.

Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J (2017), MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data, **Nucleic acids research**, Oxford University Press, 45:W180–W188.

Didion JP, Martin M, Collins FS (2017), Atropos: specific, sensitive, and speedy trimming of sequencing reads, **PeerJ**, PeerJ Inc., 5:e3720.

Donagema GK, Campos DB de, Calderano SB, Teixeira W, Viana JM (2011), Manual de métodos de análise de solo., **Embrapa Solos-Documents (INFOTECA-E)**, Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011.

Doornbos RF, Loon LC van, Bakker PA (2012), Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review, **Agronomy for Sustainable Development**, Springer, 32:227–243.

Duan M, Li H, Gu J, Tuo X, Sun W, Qian X, Wang X (2017), Effects of biochar on reducing the abundance of oxytetracycline, antibiotic resistance genes, and human pathogenic bacteria in soil and lettuce, **Environmental pollution**, Elsevier, 224:787–795.

Duarte FC, Cardoso MdG, Santiago WD, Machado AMR, Nelson DL (2017), Brazilian organic sugarcane spirits: Physicochemical and chromatographic profile, **Revista Ciência Agronômica**, SciELO Brasil, 48:288–295.

Edgar RC (2010), Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, **Bioinformatics**, Oxford University Press, 26:2460–2461.

Egamberdieva D, Kamilova F, Validov S, Gafurova L, Kucharova Z, Lugtenberg B (2008), High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan, **Environmental Microbiology**, Wiley Online Library, 10:1–9.

Egamberdieva D, Shrivastava S, Varma A. **Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants.** Nova Iorque: Springer. 42.

Fahrenfeld N, Knowlton K, Krometis LA, Hession WC, Xia K, Lipscomb E, Libuit K, Green BL, Pruden A (2014), Effect of manure application on abundance of antibiotic resistance genes and their attenuation rates in soil: field-scale mass balance approach, **Environmental science & technology**, ACS Publications, 48:2643–2650.

Fierer N, Leff JW, Adams BJ, Nielsen UN, Bates ST, Lauber CL, Owens S, Gilbert JA, Wall DH, Caporaso JG (2012), Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, 109:21390–21395.

Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G (2012), The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens, **Science**, American Association for the Advancement of Science, 337:1107–1111.

Foyer C, Zhang H. **Annual Plant Reviews, Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-genomic Era**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons. 42.

Franzosa EA, Hsu T, Sirota-Madi A, Shafquat A, Abu-Ali G, Morgan XC, Huttenhower C (2015), Sequencing and beyond: integrating molecular'omics' for microbial community profiling, **Nature Reviews Microbiology**, Nature Publishing Group, 13:360.

Garbeva Pv, Veen J V, Elsas J V (2004), Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness, **Annu. Rev. Phytopathol.**, Annual Reviews, 42:243–270.

Gliessman SR. **Agroecology: the ecology of sustainable food systems**. Boca Raton: CRC press.

Gliessman SR. **Field and laboratory investigations in agroecology**. Boca Raton: CRC Press.

Grada A, Weinbrecht K (2013), Next-generation sequencing: methodology and application, **The Journal of investigative dermatology**, Nature Publishing Group, 133, : e11.

Griffiths BS, Philippot L (2013), Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community, **FEMS microbiology reviews**, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, 37:112–129.

Guo T, Lou C, Zhai W, Tang X, Hashmi MZ, Murtaza R, Li Y, Liu X, Xu J (2018), Increased occurrence of heavy metals, antibiotics and resistance genes in surface soil after long-term application of manure, **Science of the Total Environment**, Elsevier, 635:995–1003.

Häge FM (2007), Committee Decision-making in the Council of the European Union, **European Union Politics**, Sage Publications Sage UK: London, England, 8:299–328.

Hamonts K, Trivedi P, Garg A, Janitz C, Grinyer J, Holford P, Botha FC, Anderson IC, Singh BK (2018), Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers, **Environmental microbiology**, Wiley Online Library, 20:124–140.

Hamonts K, Trivedi P, Grinyer J, Holford P, Drigo B, Anderson IA, Singh BK (2018), Yellow Canopy Syndrome in sugarcane is associated with shifts in the rhizosphere soil meta-genome but not with overall soil microbial function, **Soil Biology and Biochemistry**, Elsevier, 125:275–285.

Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998), Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products, **Chemistry & biology**, Elsevier, 5:R245–R249.

Hartmann M, Frey B, Mayer J, Mäder P, Widmer F (2015), Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming, **The ISME journal**, Nature Publishing Group, 9:1177.

Hirel B, Lea PJ. Ammonia Assimilation. In: **Plant Nitrogen**. Berlin: Springer. : 79–99.

Hirel B, Tétu T, Lea PJ, Dubois F (2011), Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable agriculture, **Sustainability**, Molecular Diversity Preservation International, 3:1452–1485.

Hou D, Wang R, Gao X, Wang K, Lin Z, Ge J, Liu T, Wei S, Chen W, Xie R et al. (2018), Cultivar-specific response of bacterial community to cadmium contamination in the rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.), **Environmental pollution**, Elsevier, 241:63–73.

Howard SA, CIE M. **An agricultural testament**. London: Prabhat Prakashan.

Huang J, Su Z, Xu Y (2005), The evolution of microbial phosphonate degradative pathways, **Journal of molecular evolution**, Springer, 61:682–690.

Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, Szklarczyk D, Jensen LJ, Mering C von, Bork P (2017), Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper, **Molecular biology and evolution**, Oxford University Press, 34:2115–2122.

Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, Cook H, Heller D, Walter MC, Rattei T, Mende DR, Sunagawa S, Kuhn M et al. (2015), eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences, **Nucleic acids research**, Oxford University Press, 44:D286–D293.

Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ (2010), Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification, **BMC bioinformatics**, BioMed Central, 11:119.

Jeschke P (2016), Pesticides and their use as agrochemicals, **Pest management science**, Wiley Online Library, 72:210–225.

Jonsson V, Österlund T, Nerman O, Kristiansson E (2016), Statistical evaluation of methods for identification of differentially abundant genes in comparative metagenomics, **BMC genomics**, BioMed Central, 17:78.

Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O’Keefe S, Mitchel T, Perry T, Kao D, Mason AL, Madsen KL et al. (2016), Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics, **Frontiers in microbiology**, Frontiers, 7:459.

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M (2013), Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG, **Nucleic acids research**, Oxford University Press, 42:D199–D205.

Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, Morishima K, Tanabe M (2018), New approach for understanding genome variations in KEGG, **Nucleic acids research**, Oxford University Press, 47:D590–D595.

Kang SM, Waqas M, Hamayun M, Asaf S, Khan AL, Kim AY, Park YG, Lee IJ (2017), Gibberellins and indole-3-acetic acid producing rhizospheric bacterium *Leifsonia xyli* SE134 mitigates the adverse effects of copper-mediated stress on tomato, **Journal of Plant Interactions**, Taylor & Francis, 12:373–380.

Kearney J (2010), Food consumption trends and drivers, **Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences**, The Royal Society, 365:2793–2807.

Klopper T, Schroth M (1981), Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth undergnotobiotic condition, **Phytopathology**, 71:642–644.

Köberl M, Schmidt R, Ramadan EM, Bauer R, Berg G (2013), The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health, **Frontiers in microbiology**, Frontiers, 4:400.

Koops HP, Pommerening-Röser A (2015), *Nitrososivibrio*, **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, Wiley Online Library:1–2.

Lazarevic V, Whiteson K, Gaia N, Gizard Y, Hernandez D, Farinelli L, Østerås M, François P, Schrenzel J (2012), Analysis of the salivary microbiome using culture-independent techniques, **Journal of clinical bioinformatics**, BioMed Central, 2:4.

Lea PJ, Mifflin BJ (2018), Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement, **Annual Plant Reviews online**, Wiley Online Library:1–40.

Levy A, Gonzalez IS, Mittelviehhaus M, Clingenpeel S, Paredes SH, Miao J, Wang K, Devescovi G, Stillman K, Monteiro F et al. (2018), Genomic features of bacterial adaptation to plants, **Nature genetics**, Nature Publishing Group, 50:138.

Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW (2015), MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph, **Bioinformatics**, Oxford University Press, 31:1674–1676.

Li R, Khafipour E, Krause DO, Entz MH, Kievit TR de, Fernando WD (2012), Pyrosequencing reveals the influence of organic and conventional farming systems on bacterial communities, **PloS one**, Public Library of Science, 7:e51897.

Lin W, Wu L, Lin S, Zhang A, Zhou M, Lin R, Wang H, Chen J, Zhang Z, Lin R (2013), Metaproteomic analysis of ratoon sugarcane rhizospheric soil, **BMC microbiology**, BioMed Central, 13:135.

Liu B, Pop M (2008), ARDB—antibiotic resistance genes database, **Nucleic acids research**, Oxford University Press, 37:D443–D447.

Loman NJ, Pallen MJ (2015), Twenty years of bacterial genome sequencing, **Nature Reviews Microbiology**, Nature Publishing Group, 13:787.

Lopes LD, Silva MC P, Andreote FD (2016), Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization, **Frontiers in microbiology**, Frontiers, 7:1341.

Lori M, Symnaczik S, Mäder P, Deyn G D, Gattinger A (2017), Organic farming enhances soil microbial abundance and activity—A meta-analysis and meta-regression, **PLoS One**, Public Library of Science, 12:e0180442.

Love MI, Huber W, Anders S (2014), Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, **Genome biology**, BioMed Central, 15:550.

Lücker S, Wagner M, Maixner F, Pelletier E, Koch H, Vacherie B, Rattei T, Damsté JSS, Spieck E, Paslier D L et al. (2010), A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, 107:13479–13484.

Lugtenberg B, Kamilova F (2009), Plant-growth-promoting rhizobacteria, **Annual review of microbiology**, Annual Reviews, 63:541–556.

Lugtenberg B, Leveau J (2007), 10 Biocontrol of Plant Pathogens: Principles, Promises, and Pitfalls, **The Rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**, CRC Press:267.

Lupatini M, Korthals GW, Hollander M de, Janssens TK, Kuramae EE (2017), Soil microbiome is more heterogeneous in organic than in conventional farming system, **Frontiers in microbiology**, Frontiers, 7:2064.

Lupatini M, Suleiman AKA, Jacques RJS, Antonioli ZI, Kuramae EE, Camargo FA de O, Roesch LFW (2013), Soil-borne bacterial structure and diversity does not reflect community activity in Pampa biome, **PLoS One**, Public Library of Science, 8:e76465.

Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M (2001), What is bioinformatics? An introduction and overview, **Yearbook of medical informatics**, Georg Thieme Verlag KG, 10:83–100.

Lynch JM, Leij F de (2001), Rhizosphere, **eLS - Reviews in Life Sciences**, Wiley Online Library.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Lee JS, Senthilkumar M, Lee KC, Sundaram S (2010), *Leifsonia soli* sp. nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil, **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Microbiology Society, 60:1322–1327.

Magarey R, Suma S, Kuniata L, Allsopp P et al. Diseases and pests encountered during a survey of *Saccharum* germplasm in the wild in Papua New Guinea. In: PK EDITORIAL SERVICES PTY LTD. Proceedings of the 2002 conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists, Queensland. **Anais...**, Queensland. : 219–227.

Manici L, Caputo F, Saccà M (2017), Secondary metabolites released into the rhizosphere by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium* spp. as underestimated component of nonspecific replant disease, **Plant and Soil**, Springer, 415:85–98.

Maron PA, Ranjard L, Mougél C, Lemanceau P (2007), Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology, **Microbial ecology**, Springer, 53:486–493.

Martin HG, Ivanova N, Kunin V, Warnecke F, Barry KW, McHardy AC, Yeates C, He S, Salamov AA, Szeto E et al. (2006), Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities, **Nature biotechnology**, Nature Publishing Group, 24:1263.

Masoudi-Nejad A, Narimani Z, Hosseinkhan N. **Next generation sequencing and sequence assembly: methodologies and algorithms**. Nova Iorque: Springer Science & Business Media. 4.

Menzel P, Ng KL, Krogh A (2016), Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju, **Nature communications**, Nature Publishing Group, 7:11257.

Mistry J, Finn RD, Eddy SR, Bateman A, Punta M (2013), Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions, **Nucleic acids research**, Oxford University Press, 41:e121–e121.

Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Sluys MA V, Kitajima JP, Truffi D, Amaral AM D, Harakava R, Oliveira JC D, Wood D, Oliveira MC D et al. (2004), The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Am Phytopath Society, 17:827–836.

Moreira L (2015), Ciências genômicas: fundamentos e aplicações, **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**.

Muller A, Schader C, Scialabba NEH, Brüggemann J, Isensee A, Erb KH, Smith P, Klocke P, Leiber F, Stolze M et al. (2017), Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture, **Nature communications**, Nature Publishing Group, 8:1290.

Nandwani D, Nwosisi S. Global trends in organic agriculture. In: **Organic farming for sustainable agriculture**. Cham, Switzerland: Springer. : 1–35.

Nesme J, Achouak W, Agathos SN, Bailey M, Baldrian P, Brunel D, Frostegård Å, Heulin T, Jansson JK, Jurkevitch E et al. (2016), Back to the future of soil metagenomics, **Frontiers in microbiology**, Frontiers, 7:73.

Newman MM, Hoilett N, Lorenz N, Dick RP, Liles MR, Ramsier C, Kloepper JW (2016), Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities, **Science of the Total Environment**, Elsevier, 543:155–160.

Organization WH et al. **Codex alimentarius: organically produced foods**. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Orr C, Stewart C, Leifert C, Cooper J, Cummings S (2015), Effect of crop management and sample year on abundance of soil bacterial communities in organic and conventional cropping systems, **Journal of applied microbiology**, Wiley Online Library, 119:208–214.

Pandey A, Chandra N, Srivastava A, Kumar D, Kumar S (2018), Antimicrobial Metabolites Producing Soil Microorganisms, Wiley Online Library.

Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG (2014), STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles, **Bioinformatics**, Oxford University Press, 30:3123–3124.

Paungfoo-Lonhienne C, Yeoh YK, Kasinadhuni NRP, Lonhienne TG, Robinson N, Hugenholtz P, Ragan MA, Schmidt S (2015), Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere, **Scientific reports**, Nature Publishing Group, 5, : 8678.

Pevsner J. **Bioinformatics and functional genomics**. West Sussex, London, Reino Unido: John Wiley & Sons.

Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2006), NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins, **Nucleic acids research**, Oxford University Press, 35:D61–D65.

Raij B van. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Ribeirão Preto, SP, Brasil: IAC.

Reganold JP, Wachter JM (2016), Organic agriculture in the twenty-first century, **Nature plants**, Nature Publishing Group, 2:15221.

Renfro B, **Distribution and conservation of reduced P metabolism operons in bacteria** (2013), title. Monografia (Mestrado em Ciências da Vida) — California State University, California.

Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J (2004), Metagenomics: genomic analysis of microbial communities, **Annu. Rev. Genet.**, Annual Reviews, 38:525–552.

Rodrigues AA et al. (2018), Isolation and Screening for Multi-Trait Plant Growth Promoting Actinobacteria from Organic Sugarcane Rhizosphere, **International Journal of Microbiology Research**, ISSN:0975–5276.

Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AK, Kent AD, Daroub SH, Camargo FA, Farmerie WG, Triplett EW (2007), Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity, **The ISME journal**, Nature Publishing Group, 1:283.

Rosendahl I, Siemens J, Kindler R, Groeneweg J, Zimmermann J, Czerwinski S, Lamshöft M, Laabs V, Wilke BM, Vereecken H et al. (2012), Persistence of the fluoroquinolone antibiotic difloxacin in soil and lacking effects on nitrogen turnover, **Journal of environmental quality**, The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil . . . , 41:1275–1283.

Sampaio DB, Araújo ASFd, Santos VBd (2008), Evaluation of biological indicators of soil quality under conventional and organic fruit farming system, **Ciência e Agrotecnologia**, SciELO Brasil, 32:353–359.

Sánchez-Bayo F, Tennekes HA (2017), Assessment of ecological risks of agrochemicals requires a new framework, **Environmental Risk Assessment and Remediation**, 1:20–28.

Schaeffer L, Pimentel H, Bray N, Melsted P, Pachter L (2017), Pseudoalignment for metagenomic read assignment, **Bioinformatics**, Oxford University Press, 33:2082–2088.

Schmalenberger A, Hodge S, Bryant A, Hawkesford MJ, Singh BK, Kertesz MA (2008), The role of Variovorax and other Comamonadaceae in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes, **Environmental microbiology**, Wiley Online Library, Dordrecht, 10:1486–1500.

Schmieder R, Edwards R, Quality control and preprocessing of metagenomic datasets, **Bioinformatics (Oxford, England)**, 27:863–864, PMID: 21278185, Disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278185>).

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW et al. (2012), Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, 109:6241–6246.

Seemann T (2014), Prokka: rapid prokaryotic genome annotation, **Bioinformatics**, Oxford University Press, 30:2068–2069.

Session Ts (2014), JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, **Codex**, 150.

Shaikh S, Wani S, Sayyed R (2018), Impact of interactions between rhizosphere and rhizobacteria: a review, **J Bacteriol Mycol**, 5:1058.

Shendure J, Ji H (2008), Next-generation DNA sequencing, **Nature biotechnology**, Nature Publishing Group, 26:1135.

Silva R, Campanari M, Funniceilli M, Pinheiro D. **Saccharome codebase** (GitHub) Disponível em: (<https://github.com/rcsbiotech/saccharome>). Acesso a 10/Set/2019.

Singh DP, Prabha R, Gupta VK, Verma MK (2018), Metatranscriptome analysis deciphers multifunctional genes and enzymes linked with the degradation of aromatic compounds and pesticides in the wheat rhizosphere, **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media SA, 9.

Singh K, Suman A, Singh P, Lal M (2007), Yield and soil nutrient balance of a sugarcane plant–ratoon system with conventional and organic nutrient management in sub-tropical India, **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Springer, 79:209–219.

Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ (2011), Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome, **Nature**, Nature Publishing Group, 480:241.

Soliman M, Eldyasti A (2018), Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review, **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, Springer, 17:285–321.

Sommer MO, Dantas G, Church GM (2009), Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora, **science**, American Association for the Advancement of Science, 325:1128–1131.

Soneson C, Love MI, Robinson MD (2015), Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences, **F1000Research**, Faculty of 1000 Ltd, 4.

Souza RSC D, Okura VK, Armanhi JSL, Jorrín B, Lozano N, Silva MJ D, González-Guerrero M, Araújo LM D, Verza NC, Bagheri HC et al. (2016), Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome, **Scientific reports**, Nature Publishing Group, 6:28774.

Streit WR, Schmitz RA (2004), Metagenomics—the key to the uncultured microbes, **Current opinion in microbiology**, Elsevier, 7:492–498.

Su JQ, An XL, Li B, Chen QL, Gillings MR, Chen H, Zhang T, Zhu YG (2017), Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistome in China, **Microbiome**, BioMed Central, 5:84.

Suzek BE, Huang H, McGarvey P, Mazumder R, Wu CH (2007), UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters, **Bioinformatics**, Oxford University Press, 23:1282–1288.

Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ (1997), A genomic perspective on protein families, **Science**, American Association for the Advancement of Science, 278:631–637.

Trevors J (2010), One gram of soil: a microbial biochemical gene library, **Antonie Van Leeuwenhoek**, Springer, 97:99.

Tringe SG, Hugenholtz P (2008), A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene, **Current opinion in microbiology**, Elsevier, 11:442–446.

Tringe SG, Mering C V, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K, Chang HW, Podar M, Short JM, Mathur EJ, Detter JC et al. (2005), Comparative metagenomics of microbial communities, **Science**, American Association for the Advancement of Science, 308:554–557.

Tripathi BM, Edwards DP, Mendes LW, Kim M, Dong K, Kim H, Adams JM (2016), The impact of tropical forest logging and oil palm agriculture on the soil microbiome, **Molecular ecology**, Wiley Online Library, 25:2244–2257.

Turner TR, James EK, Poole PS (2013), The plant microbiome, **Genome biology**, BioMed Central, 14:209.

Udikovic-Kolic N, Wichmann F, Broderick NA, Handelsman J (2014), Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, 111:15202–15207.

USDA. **National Organic Program**. (<http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?node=pt7.3.205>). [Online; Acessado em 16 de abril de 2019].

Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, Golyshin PN, Ferrer M. Molecular methods to study complex microbial communities. In: **Metagenomics**. Totowa, Nova Jérsei, EUA: Springer. : 1–37.

Wang Y, Li Q, Shi J, Lin Q, Chen X, Wu W, Chen Y (2008), Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator, **Soil Biology and Biochemistry**, Elsevier, 40:1167–1177.

White RA, Borkum MI, Rivas-Ubach A, Bilbao A, Wendler JP, Colby SM, Köberl M, Jansson C (2017), From data to knowledge: The future of multi-omics data analysis for the rhizosphere, **Rhizosphere**, Elsevier, 3:222–229.

Wiktionary. **Suffixes: ome and omics**. (https://en.wiktionary.org/wiki/Appendix:Suffixes_-ome_and_-omics). Online, Acesso em: 2019-07-30.

Willer H, Lernoud J. **The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends**. Berlim: Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM Organics International.

Willer H, Lernoud J, Huber B, Sahota A. **The world of organic agriculture, Statics and Emerging Trends, 2018**. Berlim: Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM Organics International.

Wintersdorff CJ von, Penders J, Niekerk JM van, Mills ND, Majumder S, Alphen LB van, Savelkoul PH, Wolfs PF (2016), Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer, **Frontiers in microbiology**, Frontiers, 7, : 173.

Wood DE, Salzberg SL (2014), Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments, **Genome biology**, BioMed Central, 15:46.

Wooley JC, Godzik A, Friedberg I (2010), A primer on metagenomics, **PLoS computational biology**, Public Library of Science, 6:e1000667.

Xia Y, DeBolt S, Dreyer J, Scott D, Williams MA (2015), Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices, **Frontiers in plant science**, Frontiers, 6:490.

Xiong J (2003). **Essential bioinformatics**. Nova Iorque, EUA: Cambridge University Press.

Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009), Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress, **Trends in plant science**, Elsevier, 14:1–4.

You C, Zhang C, Kong F, Feng C, Wang J (2016), Comparison of the effects of biocontrol agent *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl–mancozeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil, **Ecological engineering**, Elsevier, 91:119–125.

Yu CH (1977), Exploratory data analysis, **Methods**, 2:131–160.

Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Hashsham SA, Tiedje JM (2013), Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, 110:3435–3440.