

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/11/19.

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

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

**Sonia Villamizar Cancelado
Tecnóloga Ambiental**

2017

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

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

**Sonia Villamizar Cancelado
Tecnóloga Ambiental**

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

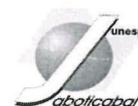
Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



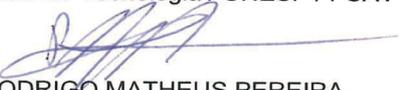
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: SONIA VILLAMIZAR CANCELADO
ORIENTADORA: LUCIA MARIA CARARETO ALVES
COORIENTADOR: DANIEL GUARIZ PINHEIRO

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


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


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


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


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


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

Jaboticabal, 28 de novembro de 2017

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

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

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

CDU 576.8:632

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

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

A todos mis seres queridos, especialmente

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

A todos, minha mais profunda gratidão!!!!

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

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

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

Keywords: Biological control, Celluloses, Phytases, Bioactive molecules

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Revisão de Literatura

2.1 O solo

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

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

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

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

2.2 Diversidade de microrganismos no solo

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

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

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

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

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

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

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

2.3 O processo de compostagem de matéria orgânica

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

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

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

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

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

2.4 Microbiologia da compostagem

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

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

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

2.5 Ferramentas para o estudo de microrganismos ambientais

2.5.1 Métodos dependentes da cultura

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

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

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

2.5.2 Métodos independentes de cultura

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.6 Metagenômica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

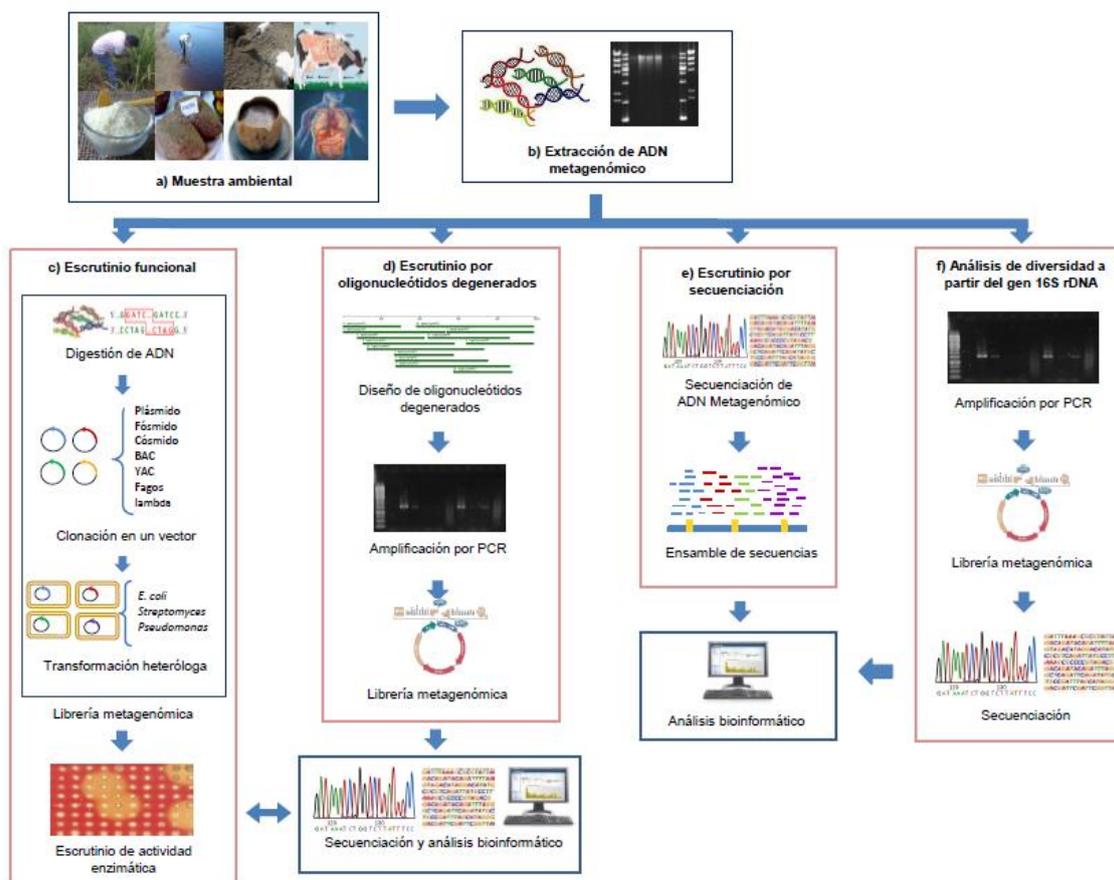


Figura1. Esquema de métodos para o estudo metagenômico de amostras ambientais (CORTÉS-LÓPEZ et al, 2014).

2.6.1 Plataformas de secuenciamento para metagenômica

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

- **Sequenciamento Sanger**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.6.2 Estratégias para o estudo de amostras metagenômicas

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

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

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

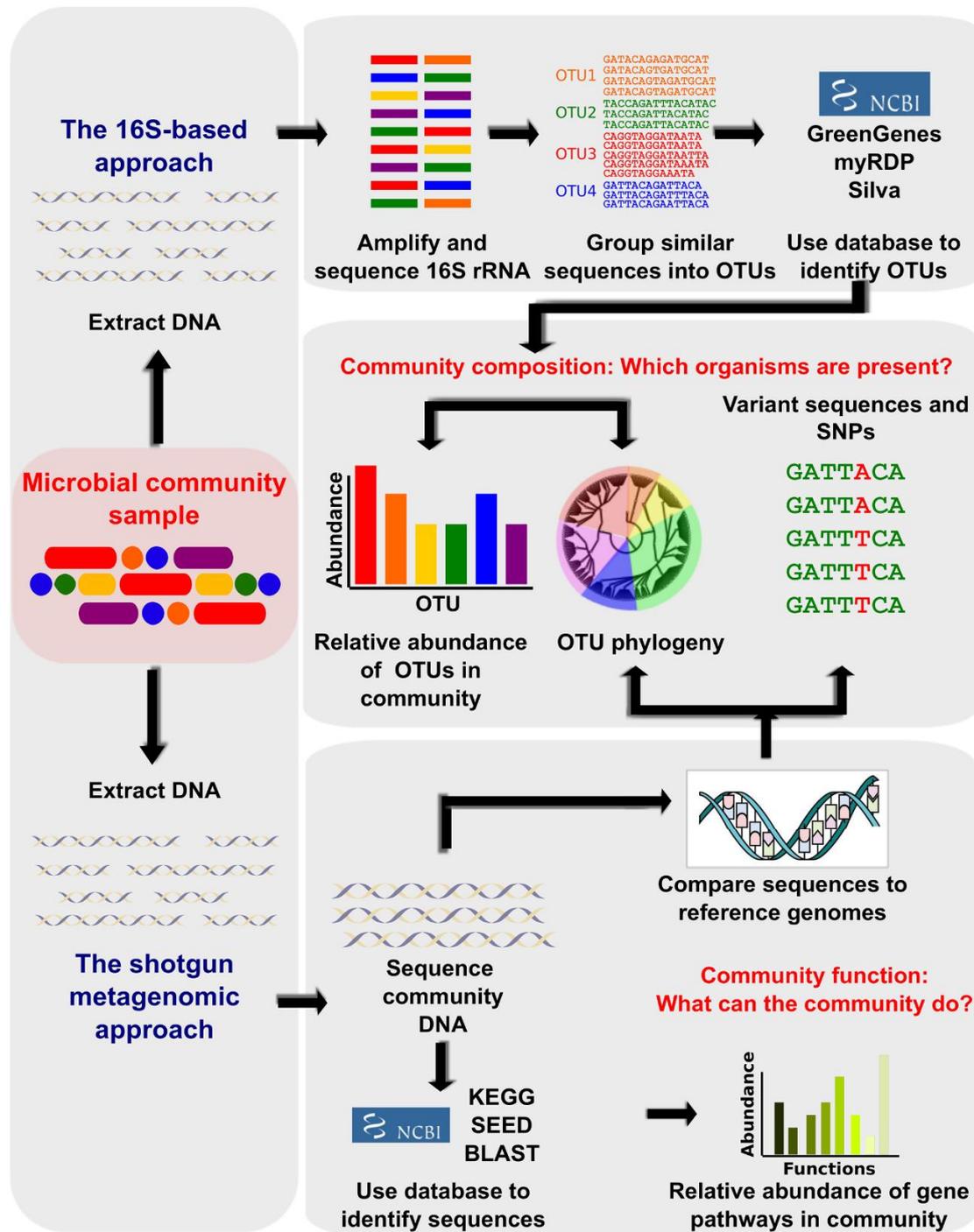


Figura 2. Metodologias Bioinformáticas no estudo da diversidade microbiana e funcional, mediante abordagens metagenômicos empregando sequenciamento de nova geração (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012).

2.6.3 Metagenômica aplicações biotecnológicas

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

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

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

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

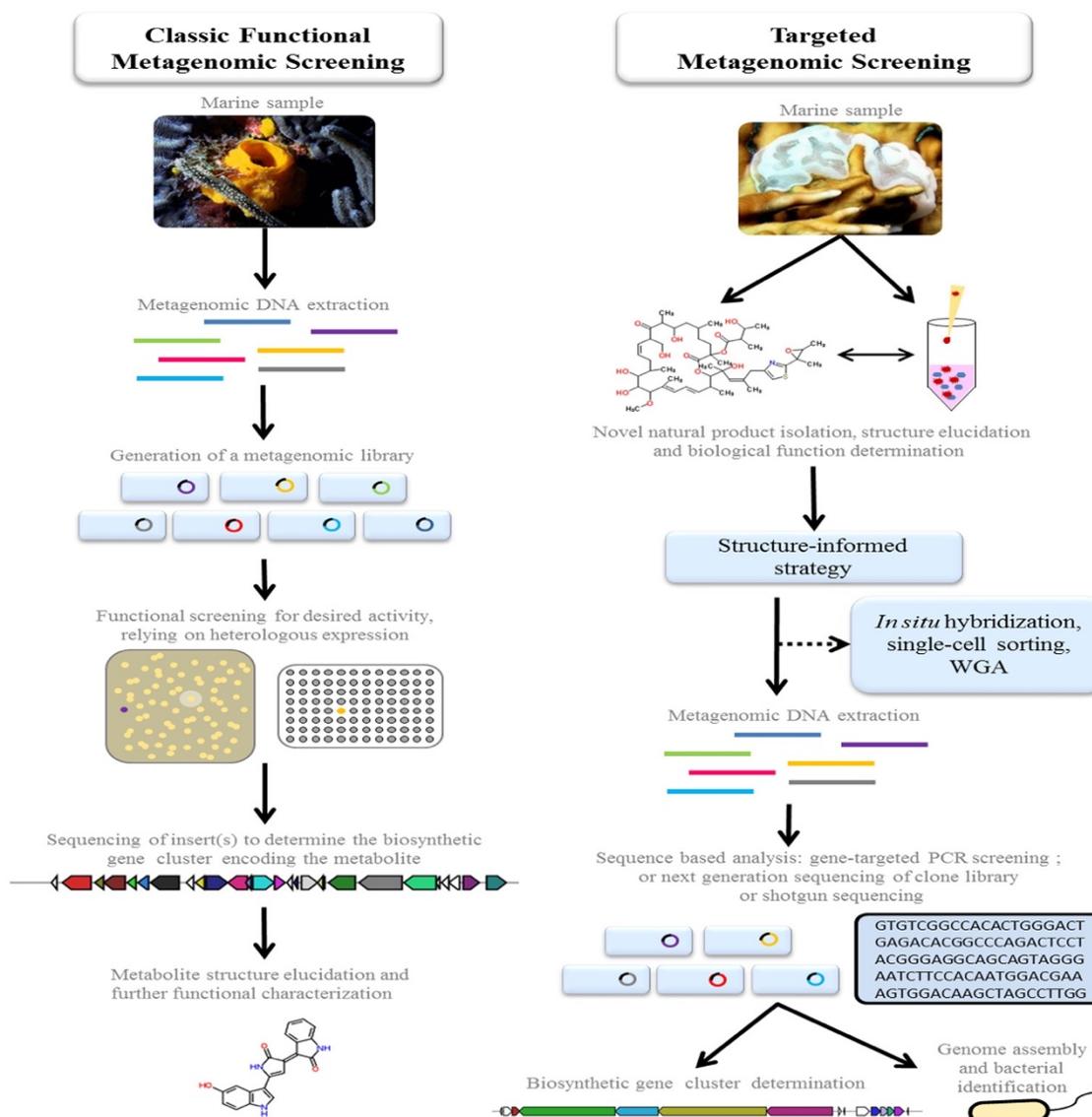


Figura 3. Comparação de abordagens metagenômicas funcionais, orientadas para a descoberta e produção de produtos naturais de interesse biotecnológico. (TRINIDADE et al., 2015).

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

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

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

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

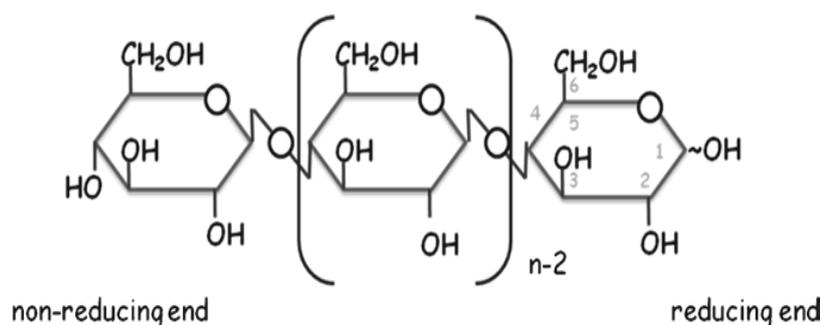


Figura 3. Estrutura de celulosa D-glicose, longo polímero ligações β -1-4. (LLMBERGER, 2010).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.7 Citricultura no Brasil

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products, **Chemistry and Biology**, vol. 5, no. 10, pp. R245–R249, 1998

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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