

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

JÉSSICA PATRÍCIA DE SÁ SOUZA

BIOPROSPECÇÃO IN SILICO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS
 α -GALACTOSIDASE E β - GALACTOSIDASE EM AMOSTRAS DE SOLO DE CINCO
MANEJOS AGRÍCOLAS

DOURADOS – MS
2020

JÉSSICA PATRICIA DE SÁ SOUZA

BIOPROSPECÇÃO IN SILICO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS
 α -GALACTOSIDASE E β - GALACTOSIDASE EM AMOSTRAS DE SOLO DE CINCO
MANEJOS AGRÍCOLAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Banca Examinadora da Universidade
Federal da Grande Dourados como exigência
parcial do ensino superior e obtenção do grau
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr Rodrigo Matheus
Pereira.

DOURADOS – MS
2020

JÉSSICA PATRICIA DE SÁ SOUZA

BIOPROSPECÇÃO IN SILICO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS
 α -GALACTOSIDASE E β - GALACTOSIDASE EM AMOSTRAS DE SOLO DE CINCO
MANEJOS AGRÍCOLAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Banca Examinadora da Universidade
Federal da Grande Dourados como exigência
parcial do ensino superior e obtenção do grau
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus
Pereira.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira – Universidade Federal da Grande Dourados

Prof.^a Dr.^a Maricy Raquel Lindenbah Bonfá – Universidade Federal da Grande Dourados

Prof.^a Dr.^a Liliam Silvia Candido – Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, MS de 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S729b Souza, Jessica Patricia De Sa
BIOPROSPECÇÃO IN SILICO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS
 α -GALACTOSIDASE E β - GALACTOSIDASE EM AMOSTRAS DE SOLO DE CINCO
MANEJOS AGRÍCOLAS [recurso eletrônico] / Jessica Patricia De Sa Souza. -- 2021.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Matheus Pereira.
TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Microbiota do solo. 2. Manejos agrícolas. 3. Hidrolases. I. Pereira, Rodrigo Matheus. II.
Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

“A felicidade está no processo e não no resultado final”.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me abençoado e me dado forças nos dias mais nebulosos e confusos. Agradeço a todos que me ajudaram, sendo com palavras, boas energias, e carinho.

Especialmente quero agradecer a minha mãe Maria do Carmo de Sá, por sempre acreditar e ser positiva sobre minhas escolhas. Meu namorado Otávio Paganotti que sempre confiou que eu daria conta de tudo que eu propusesse a fazer. Agradeço aos meus amigos que estiveram ao meu lado e por sempre me ouvirem e me motivarem, sendo eles Cassia Regina, Karolaine Bueno, Julia Pimentel, Anna Carolina, Edison Borghezan. Gostaria de citar todos que fizeram parte desse processo, mas seria impossível.

Agradeço ao meu orientador Rodrigo Matheus Pereira que sempre esteve disponível para esclarecer minhas dúvidas e por sempre motivar a ir mais longe e não desistir, por mais que fosse difícil, tornando a conclusão deste trabalho possível. Agradeço a Universidade Federal da Grande Dourados por todo conhecimento que eu pude adquirir e pelas oportunidades que me proporcionou.

RESUMO

As enzimas α -galactosidase e β -galactosidase possuem aplicações biotecnológicas, desde a área têxtil até a área da saúde. Ambas as enzimas estão presentes em vegetais, principalmente em leguminosas. Sendo o solo um ambiente com ampla diversidade microbiana, apresentando heterogeneidade em sua microbiota, traz dificuldade em sua análise de maneira convencional, devido a limitações de cultivo microbiano, tornando a aplicação de análises metagenômicas necessárias. O trabalho teve como objetivo identificar através de análises de bioinformática no DNA total metagenômico genes que codificam enzimas α -galactosidase e β -galactosidase em diferentes amostras de solo de manejos agrícolas. As cinco de solos de manejos foram coletadas e disponibilizadas pela fazenda Embrapa Agropecuária Oeste, localizada no município de Dourados-MS. As cinco amostras foram submetidas a extração do DNA total feito pelos dados de sequenciamento WGS (Whole-genome Shotgun) através da tecnologia Illumina Hiseq 2500, os dados utilizados neste trabalho foram obtidos em um estudo anterior. O sequenciamento das cinco amostras, gerou um total de 460.236 *ORFs*, que foram alinhadas posteriormente pelo programa Blastall, contra os bancos de dados das enzimas α -galactosidase e β -galactosidase, que respectivamente geraram 59010 e 12298 alinhamentos. Os dados foram exportados ao programa MEGAN 6 e posteriormente ao STAMP. As enzimas α -galactosidase e β -galactosidase foram encontradas em todas as amostras de solos, obtendo-se diferenças estatísticas significativas, que foram analisadas a nível de filo e gênero. Indicando que existe maior proporção de gêneros de bactérias.

Palavras chaves: Microbiota do Solo, Manejos Agrícolas, Hidrolases

ABSTRACT

The enzymes α -galactosidase and β -galactosidase have biotechnological applications, from the textile area to the health area. Both enzymes are present in vegetables, mainly in legumes. Since the soil is an environment with wide microbial diversity, presenting heterogeneity in its microbiota, it makes it difficult to analyze it in a conventional manner, due to limitations of microbial cultivation, making the application of metagenomic analysis necessary. The work aimed to identify through bioinformatics analysis in the total metagenomic DNA genes that encode α -galactosidase and β -galactosidase enzymes in different soil samples from agricultural managements. Five samples of management soils were collected and made available by the Embrapa Agropecuária Oeste farm, located in the city of Dourados-MS. The five samples were subjected to extraction of the total DNA made by the sequencing data WGS (Whole-genome Shotgun) through the Illumina HiSeq 2500 technology, the data used in this work were obtained in a previous study. The sequencing of the five samples, generated a total of 460,236 ORFs, which were later aligned by the Blastall program, against the databases of the enzymes α -galactosidase and β -galactosidase, which respectively generated 59010 and 12298 alignments. The data were exported to the MEGAN 6 program and later to STAMP. The enzymes α -galactosidase and β -galactosidase were found in all soil samples, obtaining statistically significant differences, which were analyzed at the level of phylum and gender. Indicating that there is a higher proportion of bacterial genera.

Key-words: Soil Microbiota, Agricultural Management, Hydrolases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. α -Galactosidase A humana	16
Figura 2. Estruturas dos α -Galactosídeos em soja: Estaquiiose e Rafinose	17
Figura 3. Esquema representando a atividade catalítica da β -galactosidase frente a molécula lactose	21
Figura 4. Imagem representativa de Beta-galactosidase em complexo com L-ribose sendo expressa por <i>Escherichia coli</i>	21
Figura 5. Fluxograma: Etapas gerais da metodologia. Os itens marcados com (*) não foram realizados neste presente trabalho	26
Figura 6. Curva de rarefação em relação às sequências de α -Galactosidase. Geradas pelo programa MEGAN 6 nas amostras dos cinco manejos	32
Figura 7. Análise de cluster (UPGMA) gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos	33
Figura 8. Análise de cluster de coordenadas principais (PCoA) gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos	34
Figura 9. Análise de Co-ocorrência positiva e negativa gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos	35
Figura 10. Análise de Co-ocorrência positiva gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos	36
Figura 11. Heatmap gerado pelo programa MEGAN 6 a nível de filo. MN (Mata Nativa); PC (Pastagem Contínua); PD (Plantio Direto); PI (Integração Lavoura Pecuária); PA (Plantio Convencional) das sequências dos genes responsáveis pela codificação da enzima α -galactosidase	37
Figura 12. Dendograma exibindo a nível de filo pertencentes a cada amostra de solo gerado pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos	38
Figura 13. Diagrama de Venn relativo às espécies de microrganismos comuns a todas as mostras e exclusivos de cada amostra. MN (Mata Nativa); PD (Plantio Direto); PC (Pastagem Contínua); PA (Plantio Convencional); PI (Integração Lavoura Pecuária) da enzima α -galactosidase	39
Figura 14. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação à pastagem contínua. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Pastagem Contínua	45
Figura 15. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação ao plantio direto. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Plantio Direto	46
Figura 16. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra pastagem contínua em relação ao plantio direto. Azul escuro: Pastagem Contínua; Azul claro: Plantio Direto	47
Figura 17. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra plantio direto em relação à integração lavoura pecuária. Azul escuro: Plantio Direto; Azul claro: Integração Lavoura Pecuária	47

Figura 18. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra plantio direto em relação ao plantio convencional. Azul escuro: Plantio Direto; Azul claro: Plantio Convencional	47
Figura 19. Curva de rarefação em relação às sequências de β -galactosidase. Geradas pelo programa MEGAN 6 nas amostras dos manejos	49
Figura 20. Análise de cluster (UPGMA) gerada pelo programa MEGAN relativa aos dados taxonômicos das cinco amostras de solos da enzima β -galactosidase	50
Figura 21. Análise de cluster de coordenadas principais (PCoA) gerada pelo programa MEGAN6 da enzima β -galactosidase nas cinco amostras de manejo	51
Figura 22. Análise de Co-ocorrência positiva e negativa gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima β -galactosidase	52
Figura 23. Análise de Co-ocorrência positiva gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima β -galactosidase	52
Figura 24. Heatmap gerado pelo programa MEGAN 6 a nível de filo.Solo 1 (Mata Nativa); Solo 2 (Pastagem Contínua); Solo 3 (Plantio Direto); Solo 4 (Integração Lavoura Pecuária); Solo 5 (Plantio Convencional) da enzima β -galactosidase	53
Figura 25. Dendograma exibindo a nível de filo pertencentes a cada amostra de solo gerado pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos ...	54
Figura 26. Diagrama de Venn relativo às espécies de microrganismos comuns a todas as mostras e exclusivos de cada amostra. MN (Mata Nativa); PD (Plantio Direto); PC (Pastagem Contínua); PA (Plantio Convencional); PI (Integração Lavoura Pecuária) da enzima β -galactosidase	55
Figura 27. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação à pastagem contínua. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Pastagem contínua	69
Figura 28. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação a integração lavoura pecuária. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro:Integração Lavoura Pecuária	70
Figura 29. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação a plantio convencional. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Plantio Convencional	70
Figura 30. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra pastagem contínua em relação a integração lavoura pecuária. Azul escuro: Pastagem Contínua; Azul claro: Integração Lavoura Pecuária	70
Figura 31. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra plantio direto em relação a plantio convencional. Azul escuro: Plantio Direto; Azul claro: Plantio Convencional	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. α -galactosidases selecionadas de fontes microbianas, vegetais, animais e suas aplicações.....	18
Tabela 2. Quantidade de sequências de α -Galactosidase e ORFs entre as 5 amostras de solos com dados não normalizados	31
Tabela 3. Microrganismos comuns a todas as amostras de solos	40
Tabela 4. Quantidade de sequências de β -galactosidase e ORFs entre as 5 amostras de solos com dados não normalizados	41
Tabela 5: Microrganismos a nível de espécie comum a todas as amostras de solos da enzima β -galactosidase.....	42
Tabela 6. Microrganismos exclusivos a amostras de solos de Integração Lavoura Pecuária referente a enzima α -galactosidase	43
Tabela 7. Microrganismos exclusivos a amostras de solos de Plantio Convencional referente a enzima α -galactosidase	45
Tabela 8. Quantidade de sequências de β -galactosidase e <i>ORFs</i> entre as cinco amostras de solos com dados não normalizados	48
Tabela 9. Microrganismos a nível de espécie comum a todas as amostras de solos da enzima β -galactosidase	56
Tabela 10. Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Mata Nativa da enzima β -galactosidase	58
Tabela 11. Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Pastagem Contínua da enzima β -galactosidase	59
Tabela 12. Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Plantio Direto da enzima β -galactosidase	62
Tabela 13. Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Integração Lavoura Pecuária da enzima β -galactosidase	64
Tabela 14. Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Plantio Convencional da enzima β -galactosidase	68

LISTA DE ABREVIACOES

16S rDNA: RNA Ribosomal 16S
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
DNA: cido desoxirribonucleico
E-value: Expectation Value
MEGAN: Metagenome Analyzer
MN: Mata Nativa
NGS: Next-generation sequencing
ORFs: Open-reading frame
PA: Pastagem Contínua
PC: Plantio convencional
PD: Plantio Direto
PI: Integração Lavoura-Pecuária
PCoA: Principal coordinate analysis
STAMP: Statistic Analysis of Taxonomic Profiles
WGS: Whole-genome shotgun

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. HIPÓTESES	15
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	15
4. REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1 α -GALACTOSIDASE	16
4.2 β -GALACTOSIDASE	20
4.3 MICROBIOTA DO SOLO	22
4.4 BIOINFORMÁTICA	23
4.5 METAGENÔMICA	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 AMOSTRAS DE SOLO	27
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA DA MICROBIOTA DAS AMOSTRAS DE SOLO	27
5.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	28
5.4 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
6.1 ENZIMA α -GALACTOSIDASE	31
6.1.1 INFERÊNCIAS ESTATÍSTICAS DA ENZIMA α -GALACTOSIDASE	45
6.2 ENZIMA β -GALACTOSIDASE	48
6.2.1 INFERÊNCIAS ESTATÍSTICAS DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE.....	69
7. CONCLUSÃO	72
8. REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

A α -galactosidase é uma enzima glicosídeo hidrolase, que está presente em muitos vegetais, têm aplicação biotecnológica e em diversas áreas industriais, muito usada na área alimentícia, pois essa enzima possui capacidade de hidrolisar oligossacarídeos, que são responsáveis pela flatulência em animais, podendo fazer com que os efeitos colaterais sejam reduzidos e até mesmo tendo o seu valor nutricional aumentado (YUJING et al., 2019). Muitos microrganismos produzem essa enzima, sendo um dos mais importantes aos da espécie de domínio da bactéria *Bacillus megaterium* que é responsável pela remoção de fatores causadores de flatulência no leite de soja (BHATIA et al., 2019).

A β -galactosidase é uma enzima que catalisa a hidrólise de uma ligação glicosídica, assim como a enzima α -galactosidase, possui aplicação biotecnológica e também em diversas áreas das indústrias. Sua principal aplicação é a fabricação de leite sem lactose e também produtos lácteos. As β -galactosidasas também são capazes de catalisar reações de transgalactosilação (GUERRERO et al., 2015).

Os manejos agrícolas são combinações práticas visando a melhoria da qualidade do solo, no presente trabalho são utilizados quatro manejos agrícolas e mata nativa. No qual se difere cada uma de suas características, o plantio convencional é o preparo tradicional. A integração lavoura pecuária envolve a integração de pecuária e agricultura, podendo até mesmo favorecer a diversidade de microrganismos, pela quantidade de matéria orgânica presente, já o plantio direto tem o preparo de manter folhagens e resíduos vegetais sob o solo. A pastagem contínua possui uma rotação de pastejo, no qual os animais permanecem em uma determinada área pelo o ano todo (LOPES, 2006).

O solo é um ambiente rico em diversidade microbiana, os microrganismos realizam a ciclagem de nutrientes, sendo responsáveis pelas características físico-químicas do solo. Porém não são todos os microrganismos que podem ser cultivados de forma tradicional e a metagenômica consegue acessar o DNA total de um ambiente, sendo uma ferramenta muito utilizada para analisar a diversidade genética e metabólica dos ecossistemas (MADHAVAN, 2017). Existem muitos caminhos diante da metagenômica e um deles é a bioinformática, uma ferramenta que possui programas de alinhamento de sequências como o BLAST que é responsável pela identificação do DNA em diferentes amostras de um determinado ambiente.

2. HIPÓTESES

H0: Não há diferenças estatisticamente significativas em relação a presença de α -galactosidase e β -galactosidase nas amostras de solo referentes aos diferentes manejos agrícolas.

H1: Pelo menos uma das amostras de solo apresentou diferenças estatisticamente significativas em comparação com as outras amostras de solo coletadas em Dourados-MS, em relação a presença de α -galactosidase e β -galactosidase.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a ocorrência dos genes que expressam as enzimas α -galactosidase e β -galactosidase nas amostras de solos de Dourados, MS sob diferentes manejos agrícolas e mata nativa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os microrganismos que produzem as enzimas α -galactosidase e β -galactosidase e sua taxonomia;
- Verificar se os diferentes tipos de manejos de solos alteram a proporção de ocorrência de microrganismos produtores α -galactosidase e β -galactosidase.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ENZIMA α -GALACTOSIDASE

As α -Galactosidases (EC 3.2.1.22) são enzimas que atuam nos galactosídeos presentes em muitos vegetais, principalmente leguminosas e cereais, com crescente importância em relação à nossa dieta. Encontram-se em aplicações biotecnológicas na indústria de alimentos e rações, indústria de produção de açúcar, indústria de papel, análise estrutural de biomacromoléculas e aplicações em medicina clínica, incluindo transformação de grupos sanguíneos, tratamento da doença de Fabry e xenotransplante (YUJING et al., 2017; ÁLVAREZ et al., 2019); (BATHIA et al., 2020).

Os Oligossacarídeos de galactose do tipo rafinose, principalmente rafinose e estaquiose, em sementes de soja e outras leguminosas, são responsáveis pela flatulência e distúrbios intestinais em humanos e animais monogástricos com deficiência de galactosidase. α -Galactosidases poderiam hidrolisar estes oligossacarídeos para melhorar o valor nutricional do leite de soja e eliminar efeitos colaterais indesejáveis (YUJING et al., 2017). Na figura abaixo se encontra a enzima α -Galactosidase A humana, sendo exibida de forma tridimensional, por MOLEKUUL, 2016.

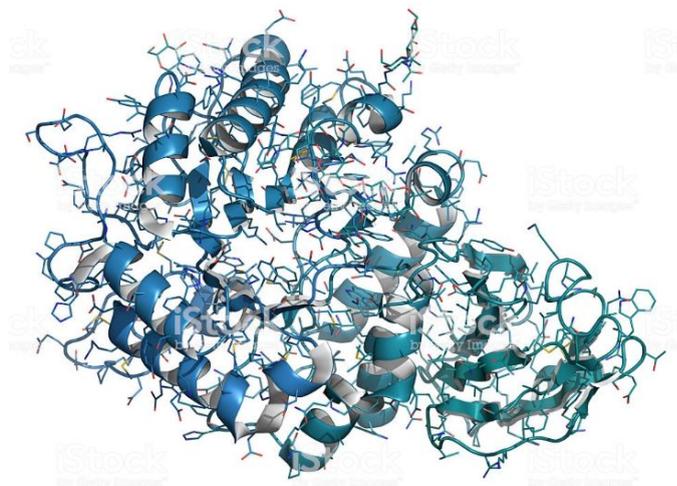


Figura 1. α -Galactosidase A humana (MOLEKUUL, 2016)

A enzima α -galactosidase é uma exoglicosidase, ou seja, ela remove um resíduo de cada vez a partir da extremidade da molécula. Sua principal função é catalisar a hidrólise de ligações terminais α -1,6 de resíduos de galactosil, provenientes de oligossacarídeos, polissacarídeos e substratos sintéticos, produzindo galactose e sacarose. Podem ser divididas em dois grupos: as que são ativas apenas em oligossacarídeos com baixo grau de polimerização e as que são ativas em substratos poliméricos (ALCÂNTARA, 2018).

Assim representado na **figura 2**. A α -Galactosidase atua sobre a estaquiose, liberando uma molécula de galactose e uma de rafinose e a partir da rafinose libera galactose e sacarose, que por sua vez pode ser lisada pela invertase para aplicação em diversos processos industriais (IAREMA, 2015).

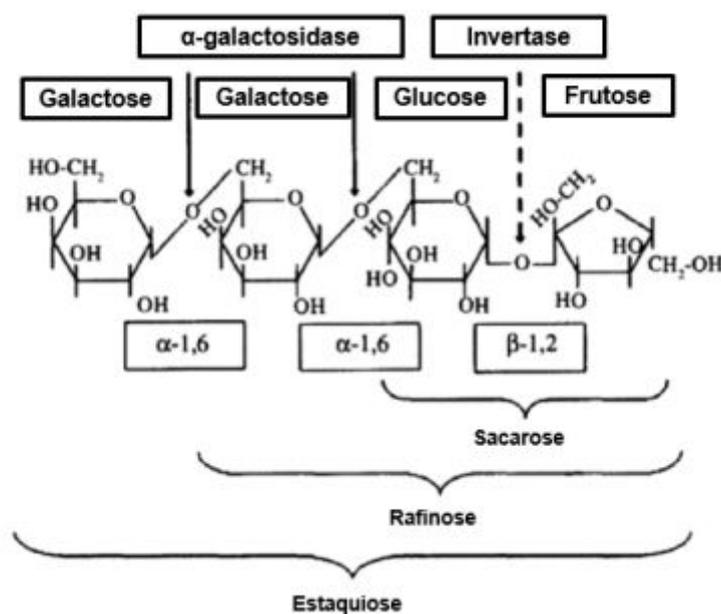


Figura 2. Estruturas dos α -Galactosídeos em soja: Estaquiose e Rafinose (Adaptado de LEBLANC et al., 2004).

Fontes clássicas da enzima α -galactosidase incluem levedura de fundo, malte de cevada, amêndoa doce, *Aspergillus niger*. A enzima é bem estudada em *Escherichia coli* na qual é induzida pela melibiose devido à presença do sistema de transporte da galactosidase. α -Galactosidases apresentam ampla distribuição em fontes vegetais, animais e microbianas,

na tabela 1 abaixo aparecem as principais fontes da enzima α -galactosidase e sua aplicação (BHATIA et al., 2020).

Tabela 1. α -galactosidases selecionadas de fontes microbianas, vegetais, animais e suas aplicações (BHATIA et al., 2020).

Domínio	Fontes Microbianas/ Vegetal/ Animal	Aplicação
Bactérias	<i>Thermus thermophilus HB27</i>	Degradação de galactomanana
	<i>Thermotoga neapolitana 5068</i>	Processamento de melado de soja
	<i>Bifidobacterium longum JCM 7052</i>	Transgalactosilação
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Processamento de comida
	<i>Thermus brockianus ITI360</i>	Processamento de papel
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Modificação da resposta imune
	<i>Bacillus stearothermophilus NUB3621</i>	Processamento de comida
	<i>Bacillus coagulans</i>	Reduza a concentração de estaquiose e rafinose na farinha de soja fermentada
	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	Degradação de RFOs, síntese de novos oligossacarídeos
	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	Degradação de RFOs
	<i>Meiothermus ruber</i>	Degradação de RFOs
	<i>Bacillus megaterium</i>	Remoção de fatores causadores de flatulência do leite de soja
	<i>Pontibacter sp. HJ8</i>	Transgalactosilação, indústria de alimentos e rações
	<i>Mesorhizobium sp. JB07</i>	Transgalactosilação e processamento de alimentos
	<i>Streptomyces sp. HJG4</i>	Transgalactosilação e processamento de alimentos
	<i>Bacillus megaterium VHMI</i>	Remoção de fatores causadores de flatulência do leite de soja
	<i>Pseudoalteromonas sp. KMM 701</i>	Transgalactosilação
<i>Clostridium josui</i>	Transgalactosilação	

Continuação: **Tabela 1.** α -galactosidases selecionadas de fontes microbianas, vegetais, animais e suas aplicações (BHATIA et al., 2020).

Bacteria	<i>Bacillus coagulans</i> NRR1207	Indústria alimentícia
	<i>Streptomyces griseoloalbus</i>	Redução no teor de rafinose da farinha de cavalo / grama verde e útil para a produção em grande escala de farinha livre de oligossacarídeos causadores de flatulência
	<i>Thermus sp. cepa</i> T2	Indústria alimentícia
	<i>Acinetobacter</i>	Degradação de GOS
Fungi	<i>Pseudobalsamia microspora</i>	Degradação de RFOs
	<i>Irpex lacteus</i>	Transgalactosilação
	<i>Pleurotus djamor</i>	Degradação de RFOs
	<i>Trichoderma sp. WF-3</i>	ND
	<i>Lentinula edodes</i>	Remoção de fatores antinutricionais na indústria de alimentos e rações
	<i>Aspergillus parasiticus</i> MTCC-2796	Transgalactosilação
	<i>Neosartorya fischeri</i>	Hidrólise do leite de soja
	<i>Agaricus bisporus</i>	Indústria alimentícia
Plantae	<i>Phaseolus coccineus</i>	Degradação de RFOs
	<i>Nicotiana tabacum</i>	ND
	<i>Nicotiana Benthamiana</i>	Tratamento da doença de Fabry
	<i>Amêndoa doce</i>	Indústria alimentícia
	<i>Cocos nucifera</i>	ND
	<i>Sementes de ervilha</i>	Superexpressão de α -galactosidase em sementes de ervilha para reduzir o teor de oligossacarídeo de rafinose
	<i>Ceretonia siliqua</i>	ND
Animal	<i>Homo sapiens (placentário)</i>	Tratamento da doença de Fabry
	<i>Homo sapiens (saliva)</i>	Tratamento da doença de Fabry
	<i>Homo sapiens (fígado)</i>	Tratamento da doença de Fabry
	<i>Rato (cérebro)</i>	ND
	<i>Helix pomatia (caracol)</i>	ND
	<i>Homarus gammarus (lagosta europeia) (região do intestino médio)</i>	ND

*Dados extraídos do artigo (BHATIA et al., 2020)

*ND = Nada consta/ Não determinado

4.2 ENZIMA β -GALACTOSIDASE

As β -galactosidases (EC 3.2.1.23) são enzimas que catalisam a hidrólise de uma ligação glicosídica entre uma unidade β - d-galactosídeo não redutora terminal e uma fração aglicona. Essa enzima tem sido utilizada principalmente para a hidrólise da lactose no leite e outros produtos lácteos. As β -galactosidases também possuem atividade de transgalactosilação que as torna muito atrativas para a obtenção de galactooligossacarídeos (RICO et al., 2017).

Essa enzima é importante devido às suas amplas aplicações nas indústrias de alimentos para fabricar produtos hidrolisados à lactose para pessoas intolerantes à lactose e à formação de produtos glicosilados. A absorção da lactose não digerida no intestino requer a atividade desta enzima; portanto, a deficiência dessa enzima leva à intolerância à lactose. A β -galactosidase é basicamente um tetrâmero de quatro cadeias polipeptídicas idênticas, sendo cada uma delas constituída por 1023 aminoácidos que se combinam para formar cinco domínios estruturais bem definidos (SAQIB et al., 2017).

As fontes de β -galactosidases são de origem microbiana, vegetal e animal. No entanto, geralmente as fontes microbianas apresentam maior produtividade, por exemplo, as β -galactosidases bacterianas trabalham com pH ideal entre 2,5 e 5,4 e a levedura β -galactosidase mostra atividade máxima a pH 6,0-7,0. As β -galactosidases também são amplamente distribuídas nas plantas, as quais desempenham papéis, contribuindo para o crescimento das plantas, a hidrólise da lactose e o amadurecimento dos frutos. É relatado que esta enzima diminui o conteúdo de galactosil da parede celular, o que facilita o processo de amadurecimento das frutas (SAQIB et al., 2017). Na **figura 3** abaixo, está sendo representado um esquema da atividade catalítica da enzima β -galactosidase frente a uma molécula de lactose, por MATTHEWS, 2005. Já na **figura 4** se encontra uma imagem representando a enzima β -galactosidase sendo expressa pela *Escherichia coli*, por SEHNAL et al., 2018.

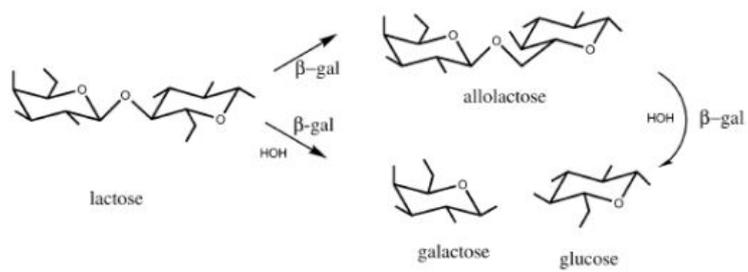


Figura 3. Esquema representando a atividade catalítica da β -galactosidase frente a molécula lactose (MATTHEWS, 2005).

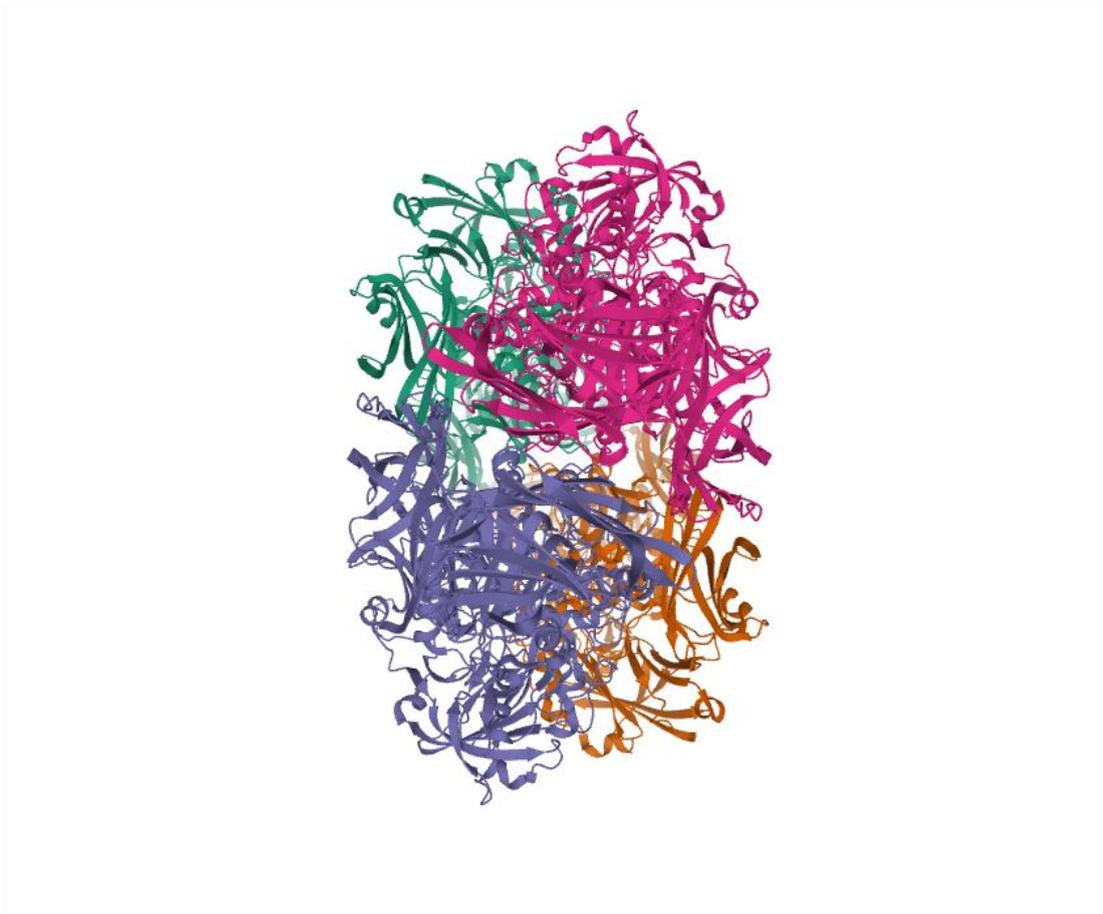


Figura 4. Imagem representativa de Beta-galactosidase em complexo com L-ribose sendo expressa por *Escherichia coli* (SEHNAL, et al. 2018).

4.3 MICROBIOTA DO SOLO

A microbiota do solo pode ser analisada para monitorar alterações nas funções do solo, já que os microrganismos realizam a ciclagem de nutrientes, sendo assim é possível utilizá-la como indicador de restauração ecológica (SILVA et al., 2019). Os microrganismos possuem um papel fundamental em influenciar a função do solo e determinar a qualidade geral do solo no ambiente terrestre, principalmente no solo agrícola (NANNIPIERI et al., 2003); (WARDLE et al., 2004); (ARIAS et al., 2005).

A restauração ecológica se inicia quando há alguma necessidade de resgatar uma determinada área do ambiente, que em muitos casos os danos não permitem chegar em resultados satisfatórios, sendo assim, as interações entre os ecossistemas mostram as necessidades do ambiente (SILVA et al., 2019).

No caso dos solos, a microbiota manifesta suas características e assim é possível determinar o quão saudável é aquela área e o quanto suas interações com os ambientes externos (Plantas, animais) determinam suas possíveis alterações de comportamento na agricultura. A biotecnologia é uma tecnologia que está interligada a diversas outras áreas, como a de ciências biológicas e no caso das interações que ocorrem nos solos, essa tecnologia tem como parte fundamental aplicações agrícolas, que recentemente se mostraram muito significativa no encapsulamento de *Trichoderma harzianum*, um agente de controle biológico usado contra fitopatógenos e bioestimulação na agricultura (MARUYAMA et al., 2020).

O solo é o habitat mais rico em diversidade microbiana, e tem estimativas de conter cerca de 10 bilhões de microrganismos por grama, abrangendo milhares de espécies de bactérias, fungos e archaea.

A inclusão de práticas de conservação do solo e mitigação da erosão agrícola do solo são indispensáveis para um manejo sustentável da agricultura. O preparo convencional causa perturbação física na camada superior do solo, criando uma base homogênea de solo com características físicas e distribuição de nutrientes relativamente uniformes. Esta prática de manejo também afeta as propriedades químicas do solo e pode resultar em diminuição da quantidade de matéria orgânica, composição alterada das comunidades de bactérias, fungos e artrópodes e redução da biodiversidade do solo espécies e níveis aumentados de microrganismos aeróbios (KRAUT et al., 2019).

O manejo do solo inclui uma combinação de atividades e práticas aplicadas ao solo buscando a produção agrícola baseando-se no seu potencial produtivo. Existem diversos

preparos dos solos que são seguidos para aprimorar a melhoria da qualidade do solo, no presente trabalho foram utilizadas cinco amostras de solo de manejos agrícolas e mata nativa, no sistema de Pastagem contínua os animais ficam na área de pastagem durante todo o ano. O sistema de Plantio direto permite a formação de matéria orgânica produzida pela palhada da leguminosa (feijão-guandu, Acácia mangium e ingá), tendo efeito principal a melhora da qualidade do solo, o tornando menos compacto, mais poroso e permeável. Já o sistema de Integração lavoura pecuária consiste na integração de atividades agrícolas e pecuárias, em rotação ou sucessão, na mesma área e em épocas distintas, possibilitando a eficiência na utilização dos recursos naturais, a preservação do meio ambiente, a estabilidade de produção e a renda do produtor. O sistema de Plantio convencional consiste em adequar o solo de maneira tradicional, possui um conjunto de práticas que são realizadas no solo, onde é preparado com uma aração que pode ser realizada por meio de um arado ou grade aradora e as gradagens, sendo uma realizada após a aração e a outra imediatamente antes do plantio, ou com duas gradagens com grades aradoras. A mata nativa é um ambiente pouco explorado pelo ser humano, possui características únicas (DELPRETE, 2020); (EMBRAPA, 2006); (LOPES et al., 2006); (MARQUES, 2006).

4.4 BIOINFORMÁTICA

Apesar da bioinformática aparentar ter surgido recentemente, esta surgiu há mais de 50 anos, quando os computadores de mesa ainda eram uma hipótese e o DNA ainda não podia ser sequenciado. Muitos pesquisadores fizeram parte e contribuíram para o avanço da bioinformática, Margaret Dayhoff (1925–1983) foi pioneira na aplicação de métodos computacionais, sua presença e participação foi tão marcante que foi nomeada "a mãe e o pai da bioinformática" por David J. Lipman. Através de resultados obtidos pela sua tese em eletroquímica, Dayhoff viu o potencial dos computadores nas áreas da biologia e da medicina. Após se tornar diretora associada do National Biomedical Resource Foundation, desenvolveu junto de Robert S. Ledley o “COMPROTEIN”, um programa de computador completo para o IBM 7090, criado para determinar a proteína estrutura primária usando dados de sequenciamento de peptídeos de Edman (GAUTHIER et al., 2018).

A bioinformática é uma ciência que une diversas áreas de conhecimento, como a biologia, ciência da computação e tecnologia da informação. Com o avanço da bioinformática

muitas ferramentas online baseadas em bancos de dados tiveram diferentes algoritmos desenvolvidos para serem utilizadas na predição de estruturas de proteínas, características biológicas, funções, epítomos (FOROUTAN et al., 2018)

Na última década foi acompanhado o desenvolvimento de uma nova tecnologia de sequenciamento, o sequenciamento de nova geração (NGS), o seu avanço proporcionou aumento no comprimento das leituras, queda nos custos e crescimento no volume de dados sequenciados. As plataformas, Hiseq / Miseq / Nextseq da Illumina e Ion PGM/Proton de Thermo-Fisher, são usadas com frequência, em aplicações de genoma completo de sequenciamento, sequenciamento transcriptoma e metagenômica (BANERJEE, et al. 2019).

Diante aos dados fornecidos pela plataforma Illumina, o Hiseq 2500 é um sistema com grande poder de flexibilidade, podendo executar diversos aplicativos. Tendo dados de alta qualidade, sendo um instrumento para os principais centros de genoma e instituições de pesquisa em todo o mundo. São apresentadas suas formas de operação, sendo modo de operação rápida e modo de operação de alto rendimento. O modo de execução rápida oferece suporte para leituras de 250 pares de bases mais pareadas. Já o modo de execução de alto rendimento permite processar em lote 6 × mais amostras do que o modo rápido e concluir grandes projetos com rapidez e eficiência.

As ciências ômicas possuem uma visão ampla das biomoléculas que constituem um organismo, assim detectam genes de uma amostra biológica específica, como o genoma, mRNA, proteínas e metabólitos. A genômica busca compreender todos os constituintes genéticos do organismo, integrando aplicações de sequenciamento, aumentando assim o entendimento a respeito de estruturas e funções de sistemas biológicos complexos, já a transcriptoma é a junção de todos os produtos de mRNAs de uma célula, ou organismo em estágio de desenvolvimento e seu objetivo principal é coletar todos RNAs, determinando a organização transcricional dos genes, assim desenvolver tecnologia para quantificação de expressão de transcrições sob distintas condições fisiológicas. A proteômica é o estudo de um proteoma, que são todas as proteínas sintetizadas por um organismo, sendo a proteína uma biomolécula complexa e composta de um polímero de aminoácidos. A metabolômica está envolvida na identificação e quantificação dos produtos metabólicos de pequenas moléculas na célula, órgão ou um organismo, o termo metaboloma teve o nome descrito em 1998 (CHAITANYA, 2019).

A metatranscriptômica é um método poderoso para estudar a composição e função de comunidades microbianas complexas, tem sido usada para estudar uma ampla gama de sistemas microbianos, incluindo a diversidade e função das comunidades simbiotes do solo da cultura (TURNER et al., 2013). A metaproteômica é baseada na espectrometria de massa (MS), e fornece informações funcionais sobre a sinalização e vias metabólicas, sendo também útil para avaliar as mudanças na expressão de proteínas (WANG et al., 2020). A metagenômica possui propriedades para simplificar a compreensão de populações microbianas e assim permite a identificação de genes de interesse. As análises metagenômicas permitem o acesso a todos os recursos genéticos presentes em um ambiente, mesmo que muitos dos microrganismos não possam ser cultivados (TERRÓN et al., 2014).

4.5 METAGENÔMICA

A palavra "Metagenômica" foi inserida pela primeira vez por volta do ano de 1998, sendo então definida como a análise de materiais genéticos isolados de amostras ambientais. Como por exemplo a microbiota do solo (FADIJI et al., 2020). Os métodos metagenômicos podem aplicar abordagens *marker gene* ou *shotgun*, dependendo do tipo de estudo a ser realizado. Inúmeras estratégias podem ser utilizadas na abordagem de análises de dados *shotgun*, tendo como início da etapa a execução de ferramentas de controle de qualidade, identificando e removendo sequências de baixa qualidade (BREITWIESER et al., 2019).

O sequenciamento *shotgun* de todo o genoma (WGS) de toda a biblioteca de clones surgiu como uma terceira abordagem para metagenômica. Ao contrário de outras abordagens, que normalmente estudam um único gene ou genomas individuais, a abordagem de *shotgun* oferece uma visão mais ampla da comunidade microbiana, permitindo avaliar melhor os níveis de diversidade filogenética e polimorfismo intraespécie. WGS também tem o potencial de identificar novos genes que são muito distintos dos genes mais conhecidos (CHEN et al., 2005).

A abordagem do gene marcador é baseada no sequenciamento de uma região específica do gene. Permite descrever a composição microbiana com base nos grupos taxonômicos presentes na amostra. Essa abordagem é frequentemente usada para analisar a biodiversidade de ecossistemas microbianos, a região do espaçador transcrito interno (ITS) (para caracterizar a composição da comunidade fúngica) e o rRNA 18S (para relatar a

ocorrência de eucariotos) e o rRNA 16S (para relatar a ocorrência de procariotos). A principal vantagem da metagenômica WGS em relação ao sequenciamento de genes marcadores é que ela oferece a possibilidade de caracterizar a diversidade genética e genômica da comunidade analisada, bem como funções potenciais e novas que estão presentes na comunidade estudada (PÉREZ et al., 2020).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A **figura 5** abaixo irá apresentar um fluxograma referente a metodologia que foi utilizada no presente trabalho, que serão descritas ao decorrer do texto.

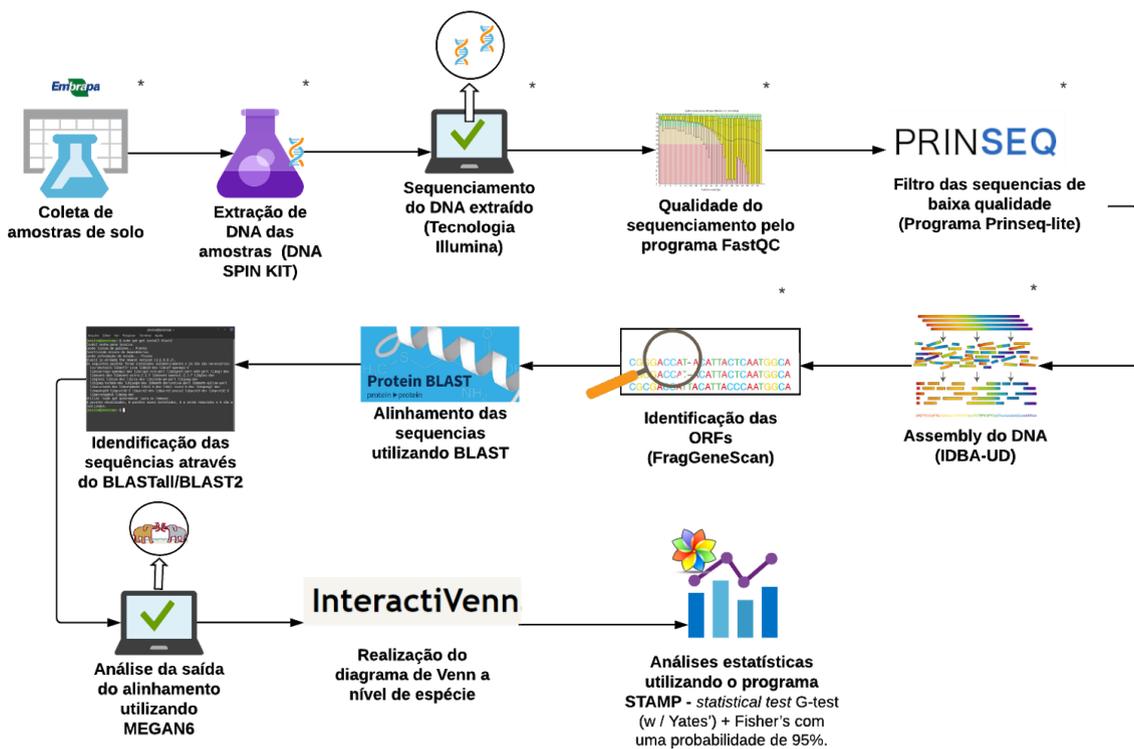


Figura 5. Fluxograma: Etapas gerais da metodologia. Os itens marcados com (*) não foram realizados neste presente trabalho

5.1 AMOSTRAS DE SOLO

As amostras dos solos foram coletadas e disponibilizadas pela Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO) localizada no município de Dourados-MS (22°14' S e 54°49' W). As amostras foram identificadas como: 1 MN – Mata Nativa (22°28'2231''S 54°81'4571''W); 2 PA – Pastagem Contínua (22°16'57.8"S 54°48'11.5"W); 3 PD – Plantio Direto (22°16'53.9"S 54°48'21.2"W); 4 PI – Integração Lavoura-Pecuária (22°16'56.0"S 54°48'15.8"W); 5 PC - Plantio Convencional (22°16'53.0"S 54°48'24.7"W).

O solo de MN é identificado pela floresta estacional semidecidual tendo dois períodos climáticos, sendo eles a chuva e a seca. O solo de PA é constituído de pastagem permanente com *Brachiaria decumbens*, estabelecido em uma área de aproximadamente 10 ha. No solo de PD existe um sistema de rotação de culturas, onde durante o verão é cultivado soja e aveia, trigo e nabo durante o inverno. O solo de PI possui pastagens relativas a área de pecuária e tem histórico de plantio de *Brachiaria decumbens* e ciclos de dois anos relativos à soja e aveia-preta. Já no solo de PC é cultivado regularmente com soja no verão, e com aveia no outono/inverno.

A amostragem foi realizada com uma profundidade de 0 a 10 cm da superfície, e contendo 10 amostras simples para então se obter uma amostra composta que fosse representante de cada área amostrada. As amostras de solos foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração e transportados para a *Facility* do Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP de Jaboticabal (LMSEQ) para realizar o sequenciamento genético.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA DA MICROBIOTA DAS AMOSTRAS DE SOLO

A extração de DNA foi realizada utilizando o DNA SPIN KIT (MOBIO LABORATORIES, 2013) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente a qualidade e quantidade do DNA foram determinadas através de fluorometria Qubit e espectrofotometria UV-Vis Nanodrop. A Relação 260/280 foi analisado no Nanodrop, apresentando os seguintes resultados: Amostra 1 - 126,10 ng/uL 1,90 (260/280), Amostra 2 - 103,90 ng/uL 1,80 (260/280), Amostra 3 - 100,50 ng/uL 1,73 (260/280), Amostra 4 - 51,0 ng/uL 1,84 (260/280), Amostra 5 - 28,5 ng/uL 1,95 (260/280).

A Relação 260/280 foi analisado no Nanodrop, apresentando os seguintes resultados: Amostra 1 - 126,10 ng/uL 1,90 (260/280), Amostra 2 - 103,90 ng/uL 1,80 (260/280), Amostra 3 - 100,50 ng/uL 1,73 (260/280), Amostra 4 - 51,0 ng/uL 1,84 (260/280), Amostra 5 - 28,5 ng/uL 1,95 (260/280).

5.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISES INICIAIS

O sequenciamento do DNA foi realizado por meio da tecnologia Illumina, através do sistema HiSeq 2500. A qualidade do sequenciamento foi aferida utilizando o programa FastQC, filtrando-se aquelas de baixa qualidade ou muito curtas através do programa Prinseq-lite (SCHMIEDER, 2011). A identificação das *ORFs* (open reading frames) foi realizada através do programa FragGeneScan (RHO et al., 2010). A montagem das sequências foi realizada através do programa IDBA-UD (PENG et al., 2012).

5.4 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

O alinhamento de sequências foi realizado através do BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), um programa de alinhamento padrão ouro. As sequências (*queries*) foram comparadas com banco de dados das enzimas α -galactosidase e β -galactosidase do *Identical Protein Group* do NCBI. A realização do download das enzimas foi necessário para a utilização do programa BLAST 2 no terminal Linux (ALTSCHUL et al. 1990). O banco de dados de α -galactosidase contém 162.552 enzimas, enquanto o banco de β -galactosidase contém 108.436 enzimas. O download do banco de dados foi feito em dias distintos, no dia 26 de dezembro de 2019 foi realizado o download da enzima α -galactosidase e no dia 10 de outubro de 2020 foi realizado o download da enzima β -galactosidase. Os arquivos dos bancos de dados foram transformados em FASTA, sendo então uma extensão que o programa BLAST consegue interpretar.

Para a enzima α -galactosidase foi utilizada a linha de comando **“makeblastdb -in alphagalactosidase.fasta -input_type fasta -title "alphagalactosidase" -dbtype prot -out alphagalactosidase”**. Já para a enzima β -galactosidase foi utilizada a linha de comando **“makeblastdb -in beta_galactosidase.fasta -input_type fasta -title "beta_galactosidase" -dbtype prot -out beta_galactosidase”**.

Os bancos de dados “alphagalactosidase” e “beta_galactosidase” continham sequências de aminoácidos de α -galactosidase e β -galactosidase de muitos microrganismos. No qual 108436 eram da enzima β -galactosidase e 162.552 eram da enzima α -galactosidase. Estes bancos de dados foram comparados com as 5 amostras de solos, sendo o solo 1 MN II, solo 2 PA I, solo 3 PD II, solo 4 PI I e solo 5 PC II. Cada uma das sequências foram comparadas utilizando o BlastP que compara sequências de aminoácidos com um banco de dados de sequências de aminoácidos.

Alguns parâmetros foram utilizados para a realização do alinhamento, a comparação utilizou o *e-value* padrão de $1 e^{-5}$. O *e-value* é um parâmetro que indica a probabilidade de um alinhamento ter ocorrido ao acaso e utilizou também o parâmetro -m 8 que permite gerar o resultado em forma tabelada. Logo abaixo está a linha de comando utilizada para realizar as comparações que tiveram os resultados encaminhados ao programa MEGAN 6. A linha de comando foi repetida 5 vezes, de acordo com o número de solos para as comparações.

“blastall -p blastp -i Solo1.faa -o Solo1.out -b 1 -e 1e-5 -m8 -a 3 -d /home/jessica/Alpha-galactosidase/alphagalactosidase.fasta”

Para a enzima “blastall -p blastp -i Solo1.faa -o Solo1.out -b 1 -e 1e-5 -m8 -a 3 -d /home/jessica/Beta-galactosidase/beta_galactosidase.fasta”

Os arquivos de saída retornados do programa BLAST foram encaminhados ao programa MEGAN 6. Neste programa foram geradas curvas de rarefação e análise de *cluster* (UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e PCoA sendo então calculada pelo método de distância de Bray-Curtis, determinando a quantidade de sequências para identificação de toda a diversidade de microrganismos produtores das enzimas α -galactosidase e β -galactosidase. No programa MEGAN 6 também foi realizada a análise de co-ocorrência e *heatmap* ambas a nível de filo, demonstrando a ocorrência dos filós e qual a frequência entre as amostras de solos (HUSON et al., 2007).

Através dos resultados obtidos pelo programa MEGAN 6, foram exportados a nível de filo e gênero para o programa STAMP, que fornece testes de hipóteses estatísticas e gráficos exploratórios para analisar perfis taxonômicos e funcionais (PARKS et al., 2014).

Tendo como parâmetros *statistical test* G-test (w / Yates') + Fisher's com uma probabilidade de 95%.

Para melhor visualizar as enzimas α -galactosidase e β -galactosidase, foi feita uma comparação a nível de espécie, trazendo resultados de microrganismos comuns a todas as amostras de solos e os que são únicos para a amostras de solos. Para isso foi utilizado o programa InteractiVenn (HEBERLE et al., 2015), gerando um diagrama de 5 conjuntos representando as 5 amostras de solos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Enzima α -Galactosidase

Foram identificadas 59010 sequências da enzima α -galactosidase, sendo elas distribuídas entre as 5 amostras de solos, como mostrado na **tabela 2** logo abaixo nesta mesma tabela também é possível ver a quantidade total de *ORFs* presentes em cada amostra de solo, com dados ainda não normalizados. Nota-se que a amostra de solo de Plantio Direto (PD), possui maior representatividade da enzima, em um total de 40669 sequências. Enquanto a amostra de solo de Plantio convencional (PC), encontra-se com menor número de sequências da enzima α -galactosidase. Na **figura 5** encontra-se em forma de gráfico a quantidade de sequências referente a enzima estudada, com dados já normalizados.

Tabela 2: Quantidade de sequências de α -Galactosidase e *ORFs* entre as 5 amostras de solos com dados não normalizados.

Solos	α-Galactosidase	ORFs
Mata Nativa	11184	46430
Pastagem Contínua	2877	137703
Plantio Direto	40669	75866
Integração Lavoura Pecuária	2853	128475
Plantio Convencional	1427	71762

*ORFs - Open reading frame

* 1-(MN); 2-(PC); 3-(PD); 4-(PA); 5-(PI)

A **figura 6** trata-se da curva de rarefação, que avalia a distribuição taxonômica entre as 5 amostras de solo, a nível de gênero. No eixo x do gráfico apresentam-se os números de sequências, já no eixo y, o número de gêneros únicos de microrganismos produtores da enzima α -galactosidase. Este gráfico tem por objetivo analisar as amostras ao chegar em um platô, onde não importa o quanto seja adicionadas mais sequências de DNA, não haverá alteração. Quando os dados chegam a um platô, no qual o gráfico indica que o DNA sequenciado foi necessário para mostrar toda a diversidade de microrganismos. Diante aos resultados do gráfico, pode se notar que a resposta é positiva.

Diante do gráfico foi possível identificar que a amostra de Plantio Convencional (PA) obteve maior diversidade de microrganismos produtores de α -galactosidase e a amostra com menor diversidade de microrganismos produtores de α -galactosidase entre as 5 amostras de solo foi a de Plantio Direto (PD).

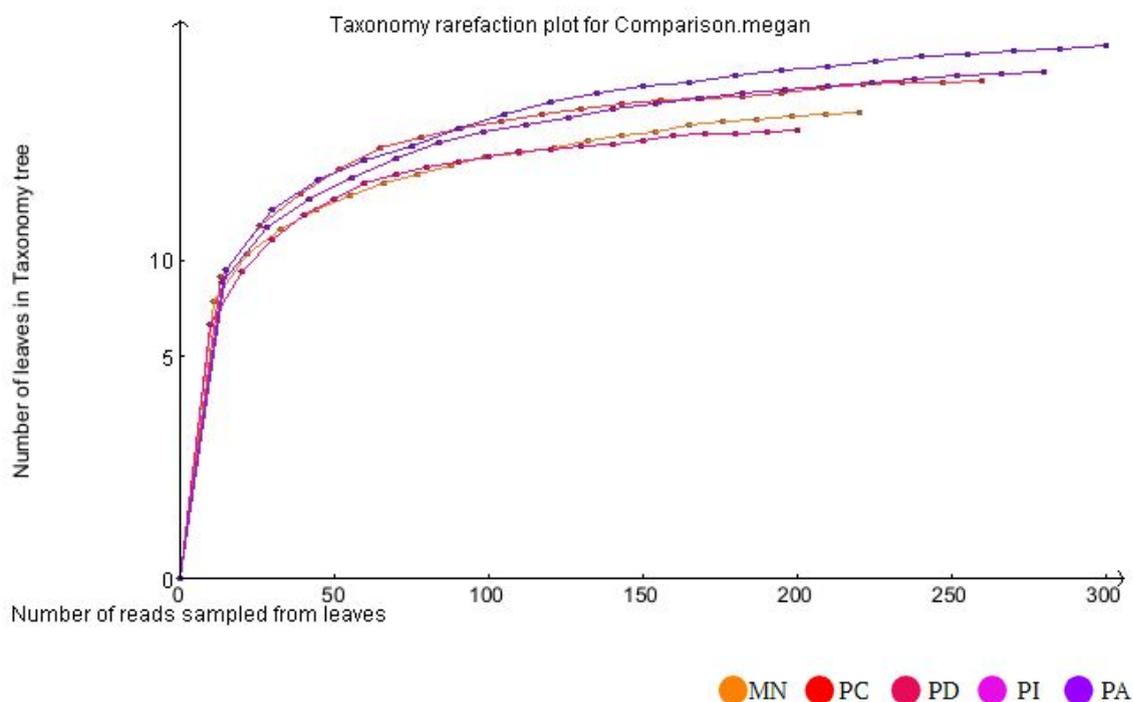


Figura 6. Curva de rarefação em relação às sequências de α -Galactosidase. Geradas pelo programa MEGAN 6 nas amostras dos cinco manejos.

Na **figura 7** encontra-se a análise de *cluster* do tipo UPGMA, gerada pelo programa MEGAN 6. Nesta análise de distância, quanto maior a ramificação menor similaridade entre as amostras de solos. Através da análise nota-se que as amostras de solos de Pastagem Contínua e Plantio Convencional possuem maior similaridade. A similaridade entre essas duas amostras de solos, possivelmente se dá pela semelhança entre os manejos agrícolas, os quais envolvem todas as técnicas recomendadas para aumentar a produtividade, conservando ou melhorando continuamente o ambiente, através de aragem e gradagem (SOUZA et al., 2018). A amostra de mata nativa, trata-se de um ambiente que sofre pouca interferência de ação antrópica, por isso encontra-se afastada das demais amostras de solos.

O preparo do solo desempenha um papel importante na formação da estrutura da comunidade microbiana e na influência de parâmetros ambientais, ecológicos, agrícolas (KRAUT et al., 2019).

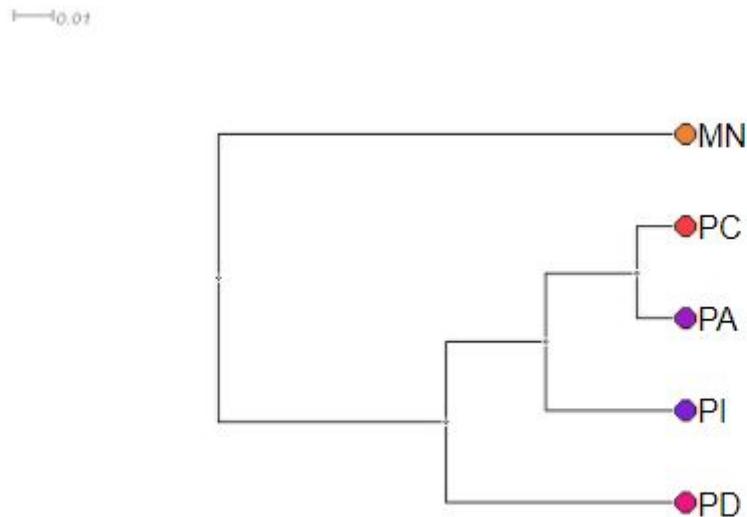


Figura 7. Análise de cluster (UPGMA) gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos.

Os resultados de PCoA estão apresentados na **figura 8**, nesta análise quanto maior a distância entre os pontos (amostras de solos) maior a dissimilaridade existente entre seus dados. Este cálculo avalia a distância entre as amostras com base nas informações filogenéticas. Diante dos resultados da **figura 8** as amostras de solos Plantio Convencional (PA), Pastagem Contínua (PC) e Integração Lavoura Pecuária (PI) estão agrupadas e distantes das amostras de solos de Plantio Direto e Mata Nativa. A análise de PcoA (**figura 8**) confirma os resultados obtidos na análise de cluster (UPGMA) exibido na **figura 7**.

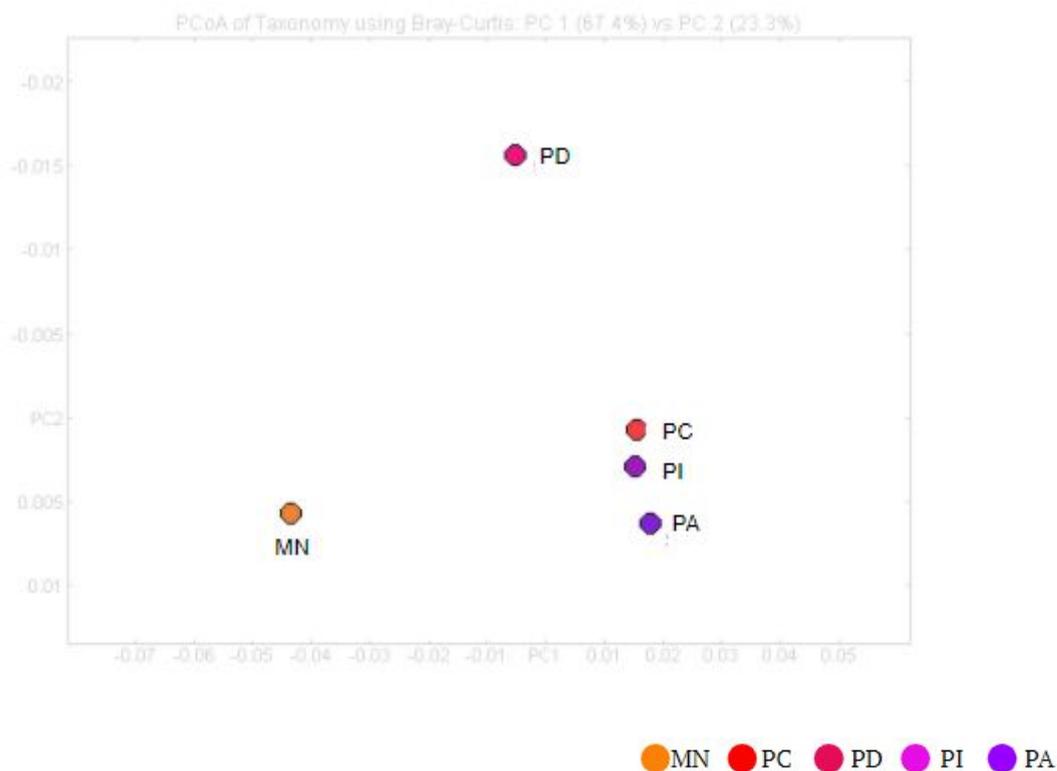


Figura 8. Análise de cluster de coordenadas principais (PCoA) gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos.

Foram gerados resultados de co-ocorrência positiva e negativa pelo programa MEGAN 6 a nível de filo presentes em cada uma das 5 amostras de solos, sendo apresentadas na **figura 9**. Nesta análise é abordado a ocorrência de filios positivos, ou seja, quando um filo ocorre simultaneamente na linha de cor verde, e aborda também a ocorrência de filios negativos, ou seja, quando um filo ocorre e o outro não ocorre. Por meio dessa análise é possível perceber que ocorrem mais ocorrências negativas entre os filios do que positivas.

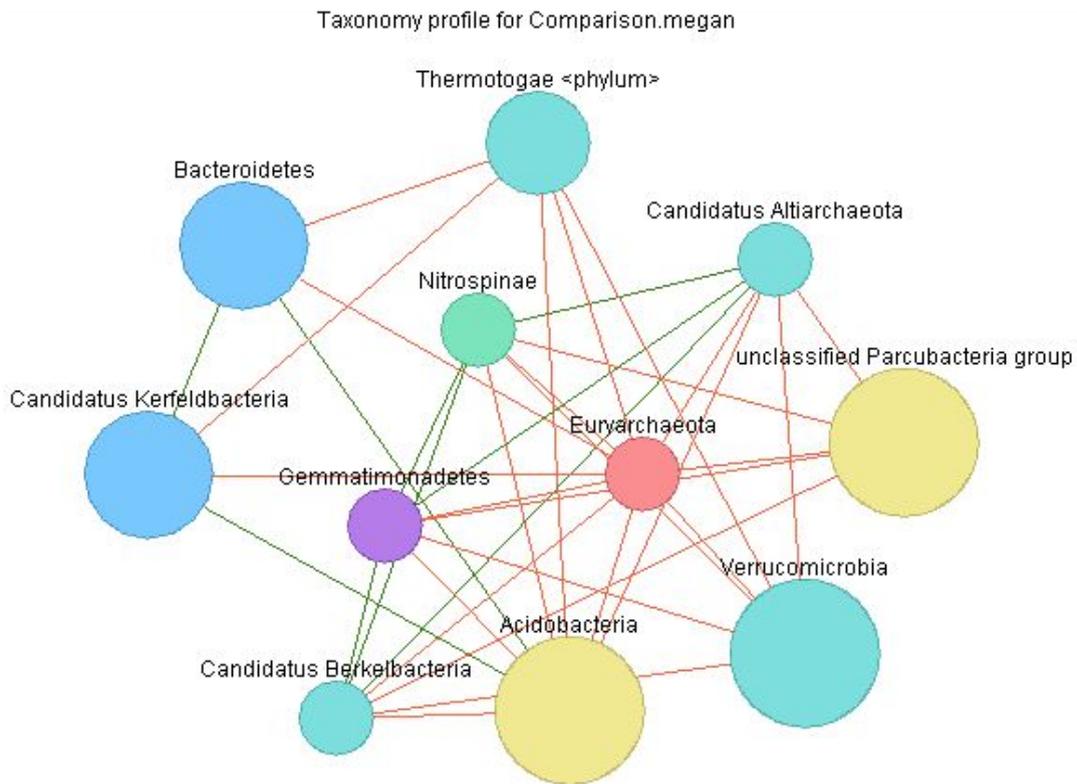


Figura 9. Análise de Co-ocorrência positiva e negativa gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos.

Na **figura 10** é apresentado apenas resultados de co-ocorrência positiva, é possível notar ocorrência positiva entre os filios de bactérias Acidobacteria, Candidatus Kerfldbacteria e Bacteroidetes. E também obteve-se ocorrência positiva entre os filios bacterianos Nitrospinae, Gemmatimonadetes, e o candidato a filo Candidatus Berkelbacteria e o candidato a filo de archea Candidatus Altiarchaeota. Os filios apresentados como “Candidatus” não possuem classificação definida. A ocorrência ocorre possivelmente por terem alguma interação entre si, mesmo que exista necessitando de análises físico-químicas, fisiológicas e genéticas para responder com propriedade.

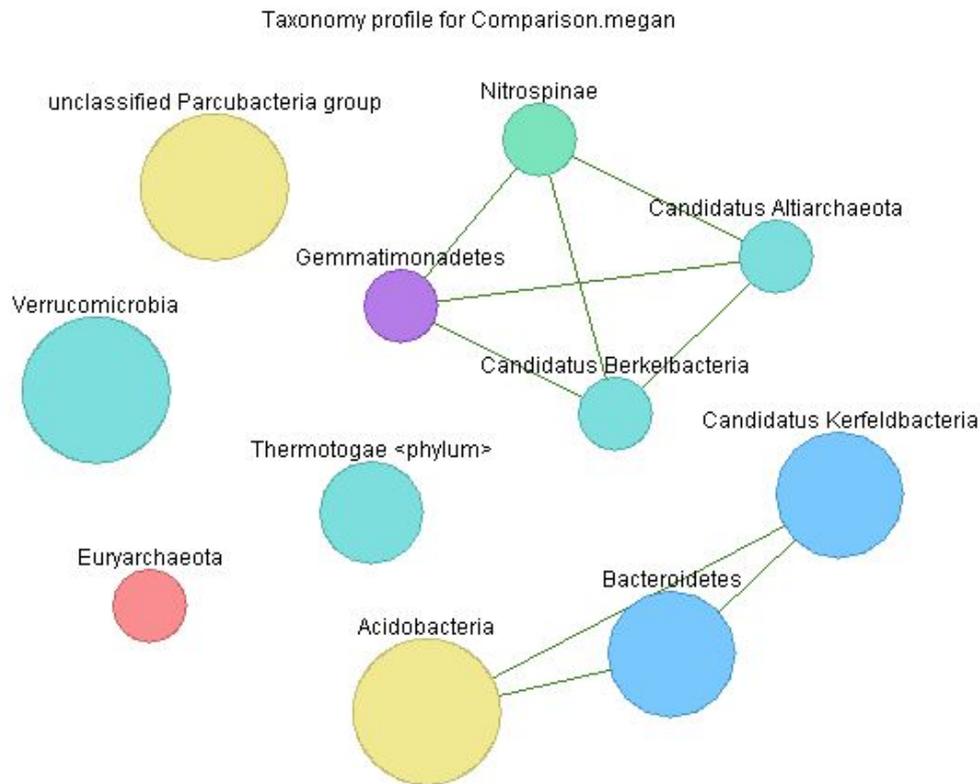


Figura 10. Análise de Co-ocorrência positiva gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos.

Na **figura 11**, encontra-se um *Heatmap* gerado pelo programa MEGAN 6 em relação aos filos pertencentes às amostras de solo. A análise varia entre as cores vermelho e azul, no qual o azul significa que menos organismos contém o filo e na cor vermelha mais organismos estão presentes no filo. Na Mata Nativa os filos predominantes são os grupos de bactérias Acidobacteria, Candidatus Kerfeldbacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia e o grupo de fungi Ascomycota.

Na Pastagem Contínua os filos que mais se encontram com representatividade de organismos são Chloroflexi e Euryarchaeota, sendo respectivamente filos de bactéria e archaea. Já no Plantio Direto o filo de bactéria Firmicutes e o filo de archaea Crenarchaeota se destacaram possuindo maior presença de organismos. Na Integração Lavoura Pecuária, o filo de fungo Basidiomycota e o filo de bactéria Chloroflexi obtiveram maior quantidade de organismos dentre todos os outros filos. Por fim no Plantio Convencional o filo candidato de bactéria Candidatus Berklbacteria, junto ao filo de bactéria Gemmatimonadetes e Nitrospinae e o filo candidato archaea Candidatus Altiarchaeota possuem maior quantidade de organismos.

Os filios que mais possuíram representatividade de organismos são diversamente estudados. Diante do estudo de Dong et al., (2017) suas análises comparativas entre duas amostras de solo retornou a presença dos filios Actinobacteria e Proteobacteria, sendo encontrada em maior quantidade.

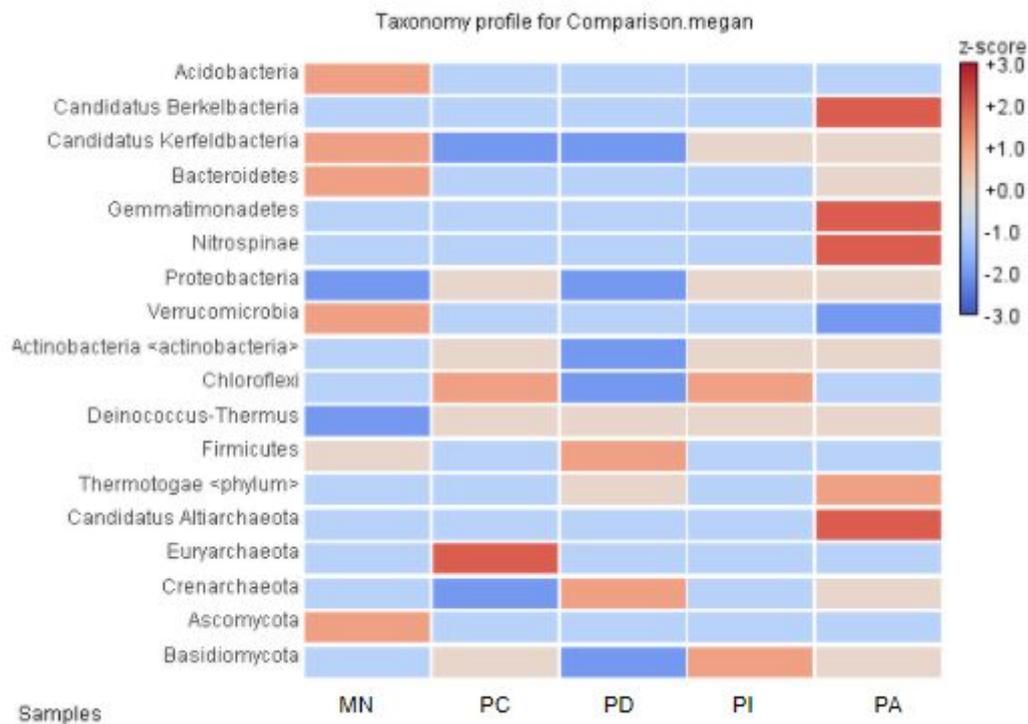


Figura 11. Heatmap gerado pelo programa MEGAN 6 a nível de filo. MN (Mata Nativa); PC (Pastagem Contínua); PD (Plantio Direto); PI (Integração Lavoura Pecuária); PA (Plantio Convencional) das seqüências dos genes responsáveis pela codificação da enzima α -galactosidase

A **figura 12** exibe um dendrograma apresentando todos os filios em relação a cada amostra de solo. Cada cor representa uma amostra de solo e a quantidade está dentro das colunas, com isso é possível verificar que o filo que possui mais organismos entre todos os solos é o filo de bactéria Actinobacteria.

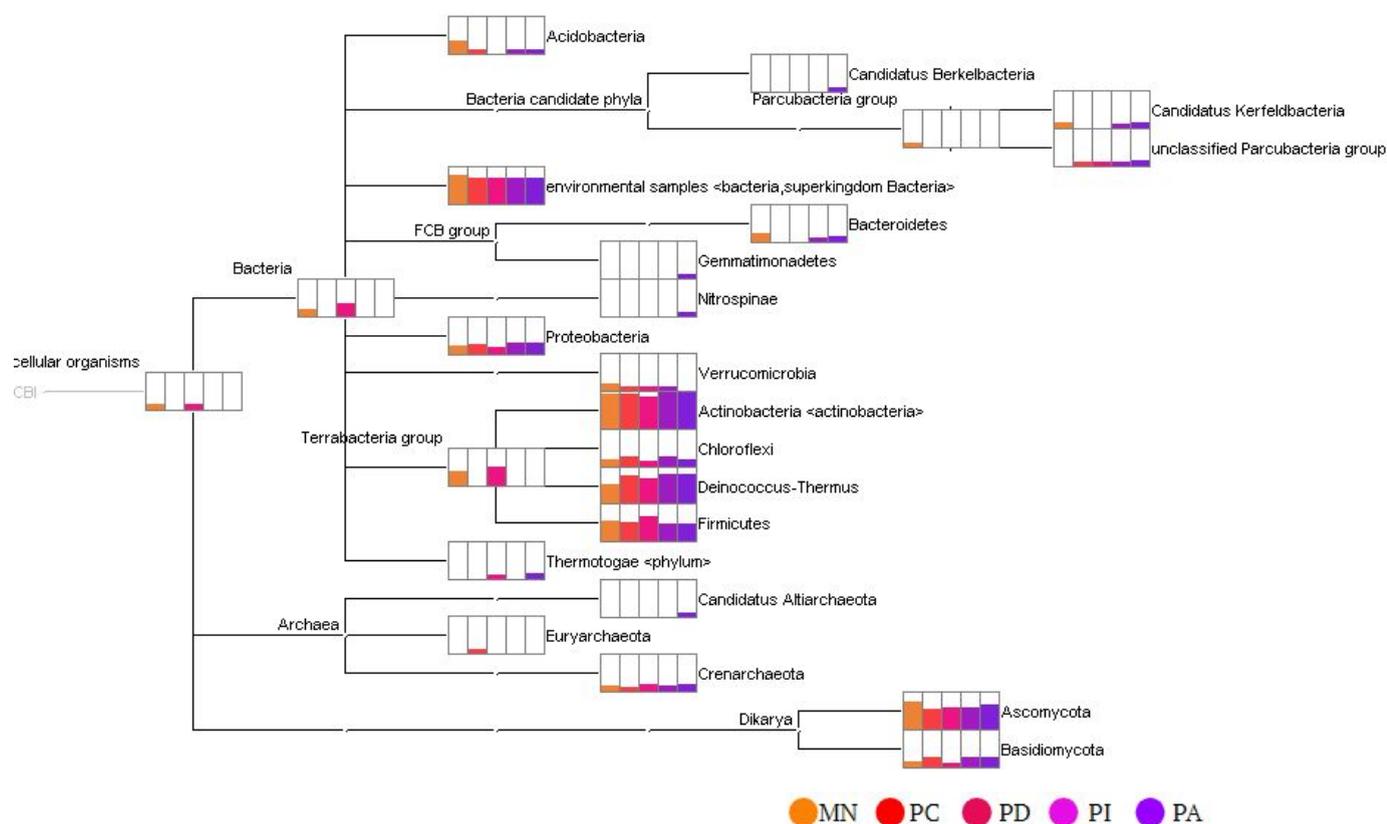


Figura 12. Dendrograma exibindo a nível de filo pertencentes a cada amostra de solo gerado pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos.

Na **figura 13** está representado o diagrama de Venn relativo às espécies de microrganismos comuns a todas as amostras de solos e exclusivos de cada amostra. Foram 17 microrganismos comuns a todas as amostras de solos, as pesquisas foram realizadas a nível de espécie, sendo eles apresentados na **tabela 3**. A amostra de solo de Plantio Direto foi a única que não apresentou espécies exclusivas. As amostras exclusivas estão exibidas nas tabelas posteriores. É possível verificar que inicialmente obteve-se um banco de dados com 59010 seqüências de DNA que codificam a enzima α -galactosidase e no diagrama de Venn o resultados foram de números bem inferiores, isso pode ser respondido ao fato de que durante a realização do diagrama, o site InteractiVenn exclui dados repetidos em cada amostra de solo de manejos agrícolas, sendo assim reduz a redundância dos resultados. Pode-se então verificar que muitas dessas seqüências foram repetidas.

Na tabela 3 é possível verificar que apenas três microrganismos foram descritos na literatura como produtor da enzima α -galactosidase, isso ocorre possivelmente devido ao fato

de que a metagenômica consegue atingir maior número de dados, obtendo mais diversidade de resultados do que a maneira de cultivo de microrganismos, sendo mais restritivo.

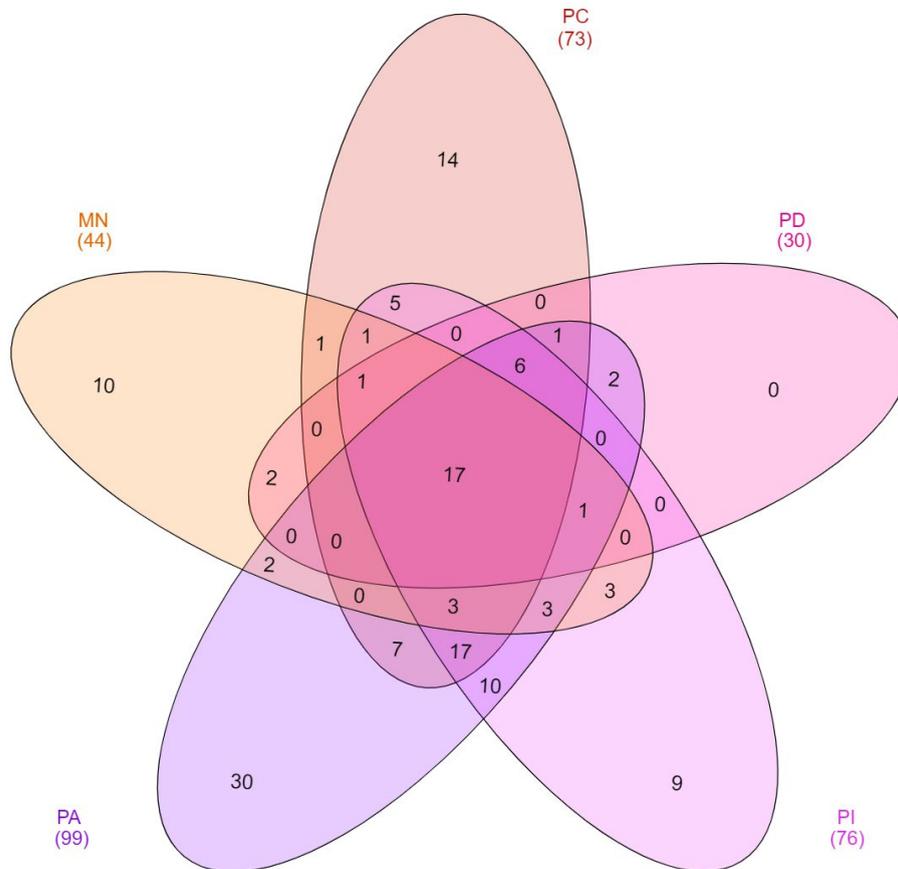


Figura 13. Diagrama de Venn relativo às espécies de microrganismos comuns a todas as mostras e exclusivos de cada amostra. MN (Mata Nativa); PD (Plantio Direto); PC (Pastagem Contínua); PA (Plantio Convencional); PI (Integração Lavoura Pecuária) da enzima α -galactosidase

Tabela 3. Microrganismos comuns a todas as amostras de solos da enzima α -galactosidase

Domínio	Microrganismos	Descrito como produtor de α -galactosidase	Referências
Bactéria	<i>Bifidobacterium longum</i>	S	GÓES et al., 2002
Bactéria	<i>Thermus brockianus</i>	S	ISHIGURO et al., 2001
Bactéria	<i>Thermus thermophilus</i>	S	AULLITO et al., 2017
Bactéria	<i>Uncultured marine bacterium In22</i>	N	
	<i>Bradyrhizobium sp. Cp5.3</i>	N	
	<i>Mycobacteroides abscessus</i>	N	
	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	N	
	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. CB02009</i>	N	
	<i>Thermogemmatispora tikiterensis</i>	N	
	<i>Bacillus sp. FJAT-44876</i>	N	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	N	
	<i>Streptococcus mutans</i>	N	
	<i>Ruminococcus gnavus</i>	N	
Fungi	<i>Talaromyces islaNicus</i>	N	
	<i>Talaromyces marneffeii</i>	N	
	<i>Fusarium proliferatum</i>	N	

*N - Não consta

**Uncultured marine bacterium In22* - Bactéria proveniente do mar, que também se encontra em solo.

A **tabela 4** irá mostrar os microrganismos presentes na amostra de solo de Mata nativa, informando também os microrganismos que já foram descritos na literatura como produtor da enzima α -galactosidase. Foram descritos apenas quatro microrganismos produtores da enzima, não foi encontrado em artigos, ou até mesmo em pesquisas, mas foram informadas no site Uniprot.org.

Tabela 4. Microrganismos exclusivos a amostras de solos de Mata Nativa referente a enzima α -galactosidase

Domínio	Microrganismos	Descrito como produtor de α -galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Uncultured Bacteroides sp.</i>	N	
	<i>Prevotella sp. CAG:487</i>	S	UNIPROT, 2013
	<i>Pseudopedobacter saltans</i>	N	
	<i>Bacteroidetes bacterium</i>	N	
	<i>Burkholderia</i>	N	
	<i>Desulfatirhabdium butyrativorans</i>	S	UNIPROT, 2020
	<i>Thermasporomyces composti</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Streptomyces carpinensis</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. 61</i>	N	
Fungi	<i>Verticillium longisporum</i>	S	UNIPROT, 2015

A **tabela 5** irá mostrar os microrganismos exclusivos na amostra de solo do manejo agrícola Pastagem Contínua referente a enzima α -galactosidase, no qual apenas cinco microrganismos foram encontrados descrito como produtor da enzima. Como dito anteriormente, os resultados se dão ao fato de que a metagenômica possui um amplo acesso a diversidade microbiana, diferente do cultivo de microrganismos, sendo assim as próximas tabelas irão apresentar poucos resultados de descrição da literatura. Como a amostra de solo do manejo agrícola de Plantio Direto não retornou resultados de microrganismos exclusivos, não será exibido uma tabela em sua referência.

Tabela 5. Microrganismos exclusivos a amostras de solos de Pastagem Contínua referente a enzima α -galactosidase

Domínio	Microrganismos	Descrito como produtor de α -galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Jiangella Alkaliphila</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Jiangella alba</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Actinoplanes globisporus</i>	N	
	<i>Micromonospora noduli</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Micromonospora pallida</i>	N	
	<i>Micromonospora sp. RP3T</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Lentzea kentuckyensis</i>	N	
	<i>Streptacidiphilus griseoplanus</i>	N	
	<i>Streptomyces fulvoviolaceus</i>	N	
	<i>Streptomyces scabiei</i>	N	
	<i>Streptomyces sp BoleA5</i>	N	
	<i>Sphaerisporangium album</i>	S	UNIPROT, 2018
Archaea	<i>Thermoplasmata archaeon</i>	N	
Fungi	<i>Aspergillus awamori</i>	N	

Na **tabela 6** encontram-se os microrganismos exclusivos da amostra de solo de manejo agrícola de Integração Lavoura Pecuária, onde apenas três foram descritos na literatura como produtor da enzima α -galactosidase. O microrganismo *Nocardioides lianchengensis* não foi encontrado na literatura, possivelmente nenhum estudo tenha sido realizado.

Tabela 6. Microrganismos exclusivos a amostras de solos de Integração Lavoura Pecuária referente a enzima α -galactosidase

Domínio	Microrganismos	Descrito como produtor de α -galactosidase	Referências
Fungi	<i>Clavispora lusitanae</i>	N	
Bactéria	<i>Nonomuraea sp. SBT364</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. XY332</i>	S	UNIPROT, 2015
	<i>Streptomyces alni</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Amycolatopsis xylanica</i>	N	
	<i>Tessaracoccus massiliensis</i>	N	
*	<i>Nocardioides lianchengensis</i>	*	*
Bactéria	<i>Nakamurella silvestris</i>	N	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	S	UNIPROT, 2020

*Microrganismo não encontrado na literatura

Na **tabela 7** estão representados os microrganismos exclusivos da amostra de solo de manejo agrícola de Plantio Convencional, seis microrganismos foram descritos como produtores de α -galactosidase. Em comparação a todas as tabelas, é possível verificar que os microrganismos descritos na literatura são de domínio de Bactéria. Os microrganismos *Prauserella sp. YM 121212*, *Streptacidiphilus carbonis albus* e *Fictbacillus sp. FJAT-27399* não foram identificados na literatura, possivelmente por não terem estudos realizados.

Tabela 7. Microrganismos exclusivos a amostras de solos de Plantio Convencional referente a enzima α -galactosidase

Domínio	Microrganismos	Descrito como produtor de α -galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Candidatus Berkelbacteria bacterium CG23_combo_of_CG06-09_8_20_14_all_41_73</i>	N	
	<i>Bacteroides sp. CAG: 709</i>	N	
	<i>Gemmatimonas sp. SG8_17</i>	N	
	<i>Nitrospinae bacterium</i>	N	
	<i>Duganella sp. HH105</i>	N	
	<i>Jiangella sp. DSM 45060</i>	N	
	<i>Jiangella sp. KE2-3</i>	N	
	<i>Intrasporangiaceae bacterium URHB0013</i>	N	
	<i>Micromonospora sp. Rc5</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Plantactinospora sp. BC1</i>	N	
	<i>Amycolatopsis sp. MJM2582</i>	N	
*	<i>Prauserella sp. YM 121212</i>	N	
Bacteria	<i>Saccharothrix sp. ST-888</i>	S	UNIPROT, 2015
*	<i>Streptacidiphilus carbonis albus</i>	*	*
Bacteria	<i>Streptacidiphilus jiangxiensis</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Streptomyces hoynatensis</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Streptomyces yanglinensis</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Streptomyces sp. CNQ865</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. CNY243</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. MMG1533</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. NRRL S-1824</i>	N	

	<i>Streptomyces sp. NRRL S-241</i>	N	
--	------------------------------------	---	--

*Microrganismo não encontrado na literatura

Continuação: **Tabela 7.** Microrganismos exclusivos a amostras de solos de Plantio Convencional referente a enzima α -galactosidase

Bacteria	<i>Streptomyces sp. RSD-27</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. WM6373</i>	N	
	<i>Sphaerisporangium canum</i>	N	
	<i>Kouleothrix aurantiaca</i>	S	UNIPROT, 2016
*	<i>Fictbacillus sp. FJAT-27399</i>	N	
Bacteria	<i>Paenibacillus lautus</i>	N	
	<i>Firmicutes bacterium</i>	N	
	<i>Candidatus Altiarchaeum sp. CG12_big_fil_rev_8_21_14_0_65_33_22</i>	N	

*Microrganismo não encontrado na literatura

6.1.1. INFERÊNCIAS ESTATÍSTICAS DA ENZIMA α -GALACTOSIDASE

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa STAMP. As comparações foram feitas em pares a nível de filo, analisando o perfil de abundância taxonômica, com 95% de diferença estatística significativa. Iniciou-se as análises com a amostra de solo de Mata Nativa com todas as outras amostras de solos. Na **figura 14** está representado os resultados da comparação entre Mata Nativa e Pastagem Contínua. É possível perceber que o filo Deinococcus-Thermus possui diferença estatística significativa, ocorrendo mais na amostra de solo de Pastagem Contínua, e os filios Acidobacteria, Ascomycota e Bacteroidetes possuem maior ocorrência na amostra de solo de Mata Nativa.

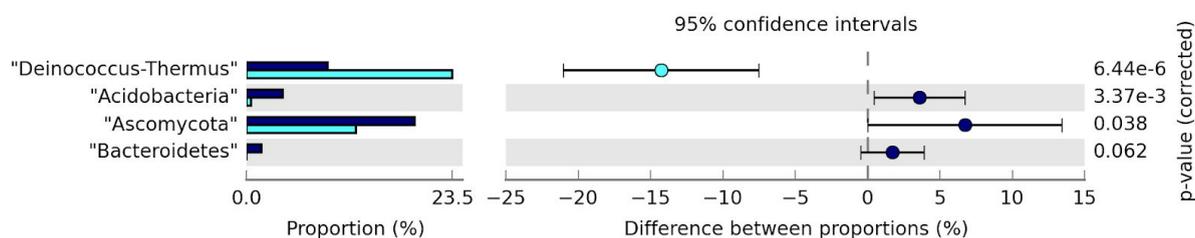


Figura 14. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação à pastagem contínua. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Pastagem Contínua.

Na **figura 15** o filo Ascomycota possui maior diferença estatística significativa, ocorrendo mais em Mata Nativa, e o filo Deinococcus-Thermus possui maior ocorrência em Plantio Direto, isso possivelmente está ligado ao fato da Mata Nativa possuir maior matéria orgânica, por não ter interferência significativa antrópica, o solo mantém por muito tempo as folhagens, fazendo com que tenha um tempo lento de decomposição, favorecendo o crescimento dos fungos. Já nas comparações de Mata Nativa e Integração Lavoura Pecuária e entre Mata Nativa e Plantio convencional obteve-se o mesmo resultado tendo o filo Deinococcus-Thermus possuindo maior diferença estatística significativa, não sendo necessário a exibição dos gráficos de proporções.

O filo Deinococcus-Thermus tem origem de uma linhagem antiga que contém algumas das espécies do domínio Bacteria mais conhecidas. O filo se distingue dos outros por sua resistência a altas exposições a radiação ionizante e luz ultravioleta (BATTISTA, 2016). Sendo um filo muito pesquisado em solos, como diz o estudo de HEMMAT et al., (2020).

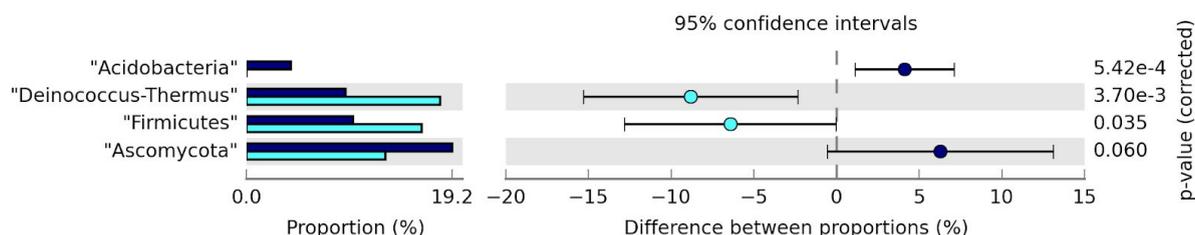


Figura 15. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação ao plantio direto. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Plantio Direto.

O gráfico de proporções da **figura 16** possui o filo *Deinococcus-Thermus* ocorrendo com mais diferença estatística significativa na amostra de solo de Pastagem Contínua, enquanto o filo *Firmicutes* ocorre mais em Plantio Direto. É possível notar que o filo *Deinococcus-Thermus* possui preferência ocorrendo em quase todas as comparações.

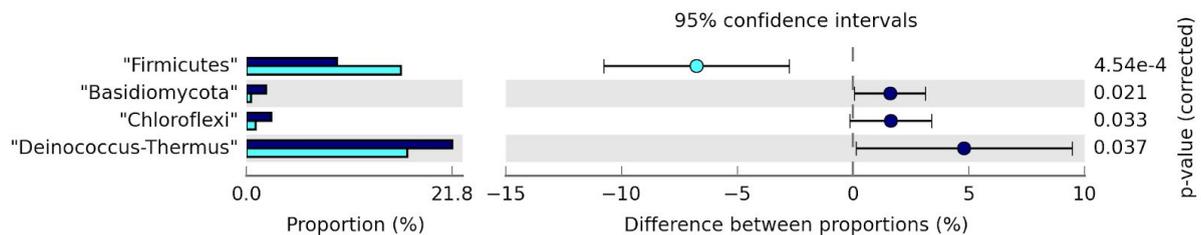


Figura 16. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra pastagem contínua em relação ao plantio direto. Azul escuro: Pastagem Contínua; Azul claro: Plantio Direto.

Na **figura 17** o filo *Deinococcus-Thermus* apresenta diferença estatística significativa, ocorrendo em maior abundância na amostra de solo do manejo de Integração Lavoura Pecuária, enquanto o filo *firmicutes* ocorre mais na amostra de solo de manejo de Plantio Direto. Já na **figura 18**, o gráfico de proporções mostra que apenas um microrganismo mostrou diferença significativa, sendo ele do filo *Firmicutes*.

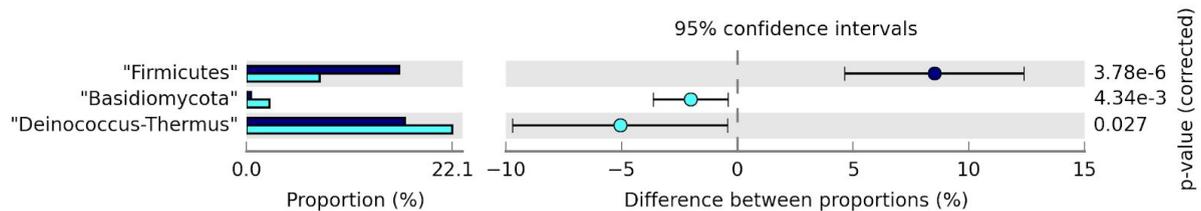


Figura 17. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra plantio direto em relação à integração lavoura pecuária. Azul escuro: Plantio Direto; Azul claro: Integração Lavoura Pecuária.

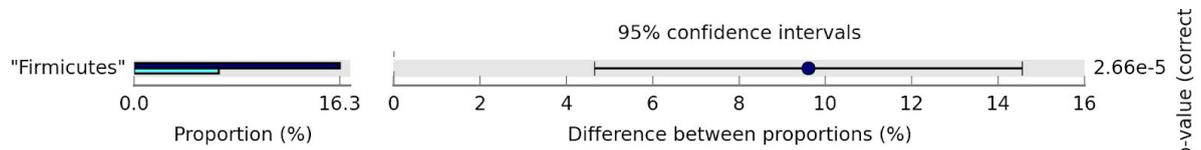


Figura 18. Abundância de microrganismos produtores de α -galactosidase a nível de filo da amostra plantio direto em relação ao plantio convencional. Azul escuro: Plantio Direto; Azul claro: Plantio Convencional.

6.2 Enzima β -galactosidase

Tabela 8: Quantidade de sequências de β -galactosidase e *ORFs* entre as cinco amostras de solos com dados não normalizados.

Solos	Beta-galactosidase	ORFs
Mata Nativa	1150	46430
Pastagem Contínua	3690	137703
Plantio Direto	2067	75866
Integração Lavoura Pecuária	3531	128475
Plantio Convencional	1860	71762

*ORFs - Open reading frame

* 1-(MN); 2-(PC); 3-(PD); 4-(PA); 5-(PI)

A **figura 19** trata-se de uma curva de rarefação, realizada através do programa MEGAN 6, avaliando a distribuição taxonômica das cinco amostras de solos avaliadas a nível de gênero. No eixo x do gráfico estão dispostos os números de sequências, enquanto no eixo y, o número de microorganismos.

Após verificar o gráfico é possível identificar que a amostra de solo de Mata Nativa possui maior diversidade de microrganismos produtores de β -galactosidase, enquanto a amostra de solo de Pastagem Contínua possui menor diversidade de microrganismos.

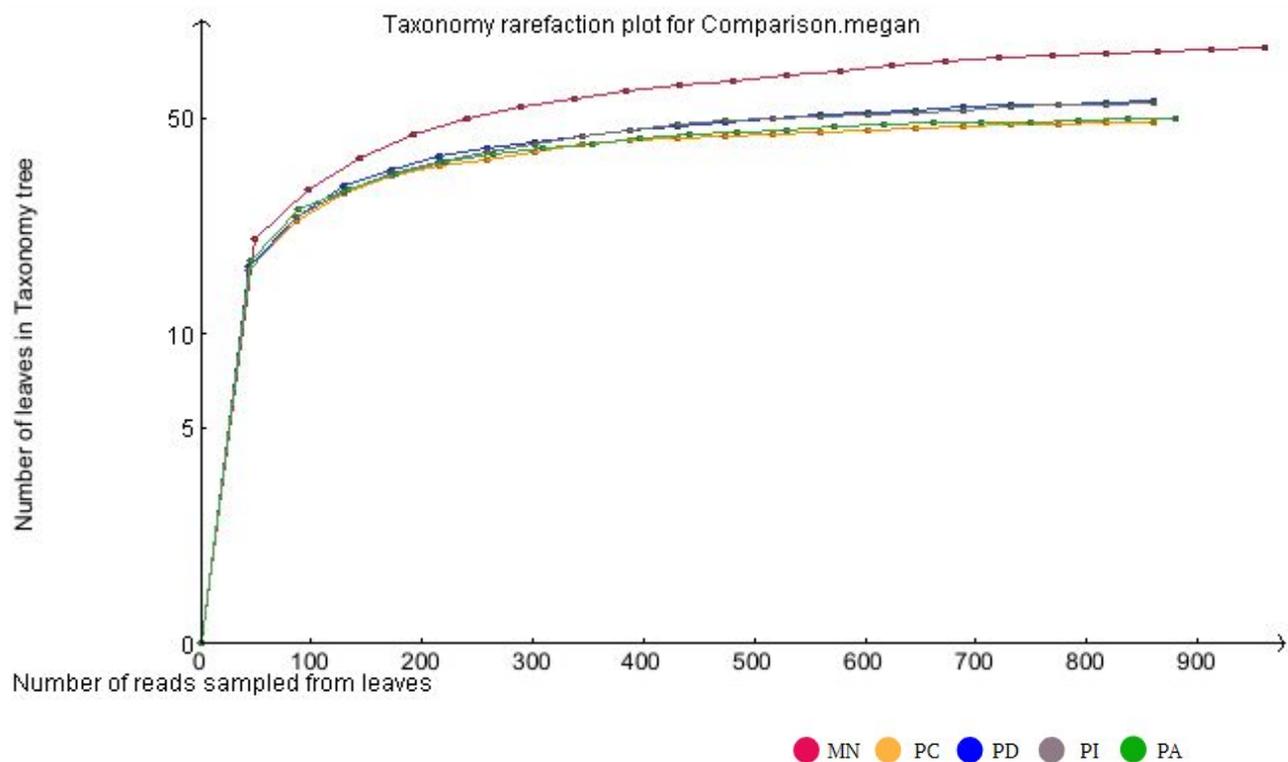


Figura 19. Curva de rarefação em relação às sequências de β -galactosidase. Geradas pelo programa MEGAN 6 nas amostras dos manejos.

A **figura 20** exibe a análise de *cluster* do tipo UPGMA gerada pelo programa MEGAN 6. Nesta análise de distância, quanto maior a ramificação menor similaridade entre as amostras de solos. Através da análise nota-se que entre as amostras de solo de Mata Nativa se encontra isolada das demais amostras, isso ocorre devido às características do solo, sendo então um solo com pouca interferência significativa de ações antrópicas, suas características e organismos que são naturais ao ambiente. Nota-se que as amostras de solos que mais possuem similaridade são Pastagem Contínua e Integração Lavoura Pecuária, isso ocorreu provavelmente devido a semelhança entre as amostras de solos, que durante a fase de criação de gado podem aumentar a concentração de microrganismos do rúmen no solo, que tem a capacidade de produzir maior número de enzimas β -galactosidases (DADHEECH et al., 2018).

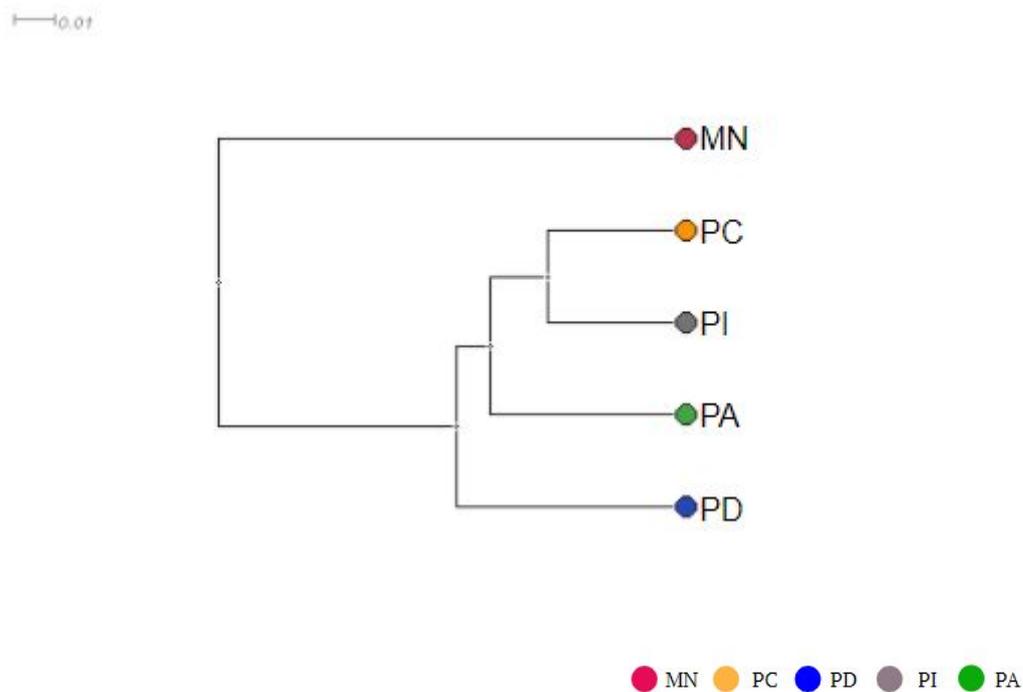


Figura 20. Análise de cluster (UPGMA) gerada pelo programa MEGAN relativa aos dados taxonômicos das cinco amostras de solos da enzima β -galactosidase

Os resultados de PCoA estão apresentados na **figura 21**, nesta análise quanto maior a distância entre os pontos (amostras de solos) maior a dissimilaridade existente entre seus dados. Este cálculo avalia a distância entre as amostras com base nas informações filogenéticas. As amostras de solos de Pastagem Contínua e Integração Lavoura Pecuária tendem a se agrupar, se distanciando das outras amostras de solos, sendo a Mata Nativa a amostra mais distante, isso ocorre pelas características semelhantes que as amostras possuem, como dito anteriormente. A análise de PcoA apresentada na **figura 21**, confirma os resultados obtidos da análise de cluster (UPGMA) exibido na **figura 20**.

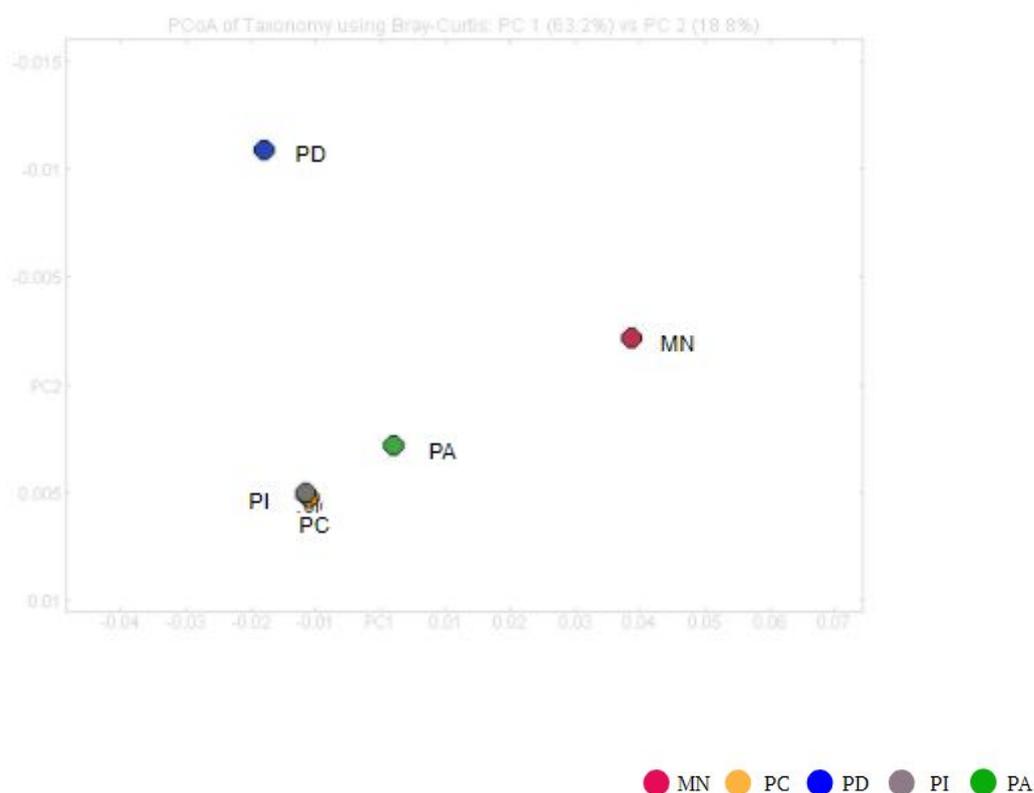


Figura 21. Análise de cluster de coordenadas principais (PCoA) gerada pelo programa MEGAN6 da enzima β -galactosidase nas cinco amostras de manejo

As figuras a seguir representam resultados de co-ocorrência positiva e negativa pelo programa MEGAN 6 a nível de filo presentes em cada uma das 5 amostras de solos, sendo apresentadas na **figura 22**, os círculos apresentam os filios e o tamanho dos círculos indicam a quantidade de sequências de DNA que codificam a enzima β -galactosidase. Nesta análise é abordado a ocorrência de filios positivos, ou seja, quando um filo ocorre simultaneamente na linha de cor verde, e aborda também a ocorrência de filios negativos, ou seja, quando um filo ocorre e o outro não ocorre. Por meio dessa análise é possível perceber que ocorrem mais ocorrências negativas entre os filios do que positivas. Na **figura 23** estão apenas os resultados de co-ocorrência positiva, é possível notar ocorrência positiva entre Thaumarchaeota, sendo um filo proposto para o domínio Archaea estando em co-ocorrência positiva com o filo Chordata que constituem um filo dentro do reino Animalia e também houve co-ocorrência positiva entre Euryarchaeota um filo do domínio Archaea e Spirochaetes um filo de domínio de bactéria. Nota-se que a ocorrência são de filios distintos.

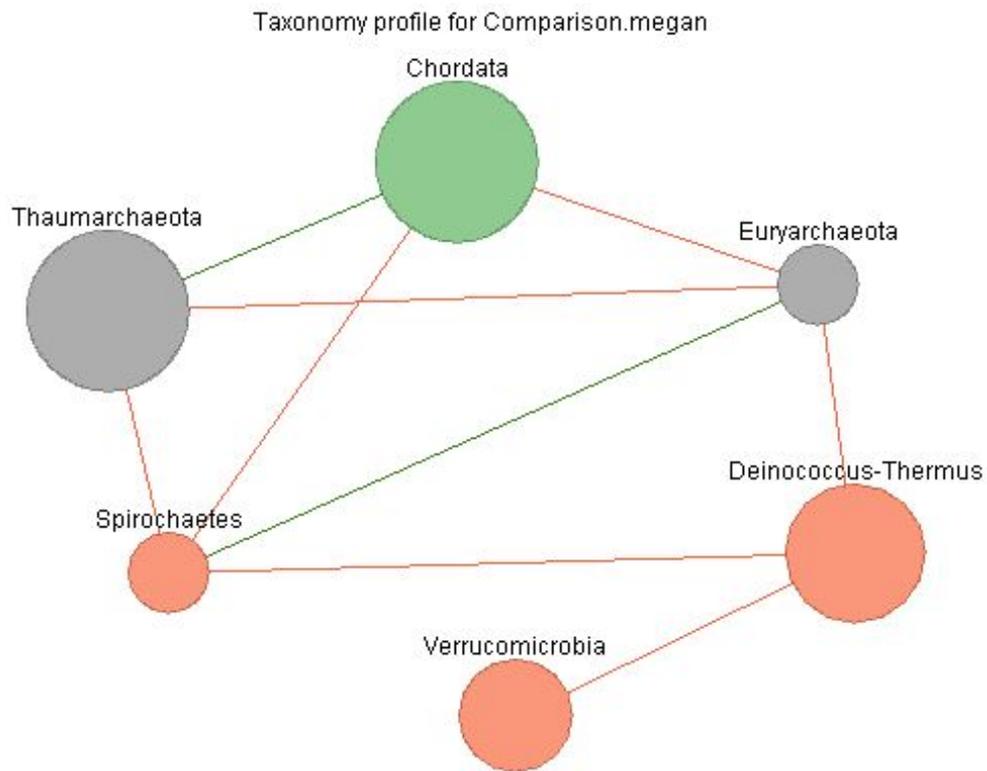


Figura 22. Análise de Co-ocorrência positiva e negativa gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima β -galactosidase

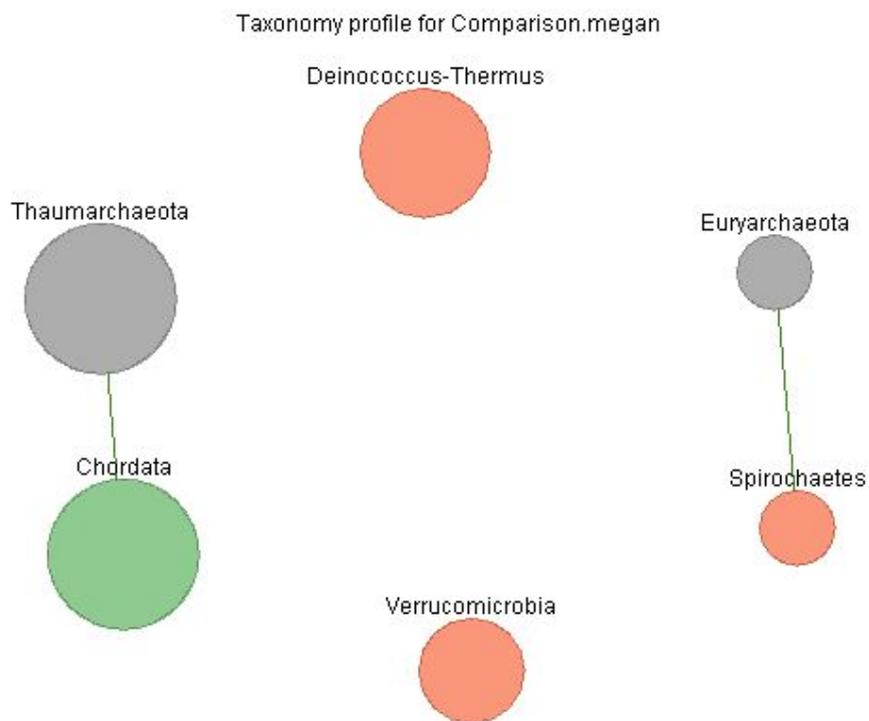


Figura 23. Análise de Co-ocorrência positiva gerada pelo programa MEGAN 6 da enzima β -galactosidase

A seguir se encontra um *Heatmap* gerado através do programa MEGAN em relação aos filos pertencentes às amostras de solo. A análise varia entre a cor vermelha e a cor azul, a cor azul apresenta menor quantidade organismos que se encontram no determinado filo, enquanto a cor vermelha, mais organismos se encontram no determinado filo. Na Mata Nativa os dois filos mais predominantes são Spirochaetes e Euryarchaeota, sendo um filo de domínio bactéria e o outro filo de domínio archaea. A Pastagem Contínua apresenta o filo de domínio bactéria Firmicutes e o filo candidato Candidatus Kryptonia possuem maior representatividade de organismos.

No Plantio Direto os filos que mais se destacaram foram de domínio, bactéria Actinobacteria, Chloroflexi e Deinococcus-Thermus, possuindo relação entre a quantidade de organismos, sendo os mais predominantes. Já a Integração Lavoura Pecuária mostra que o filo candidato Candidatus Kryptonia e o filo de algas Chlorophyta são os que mais se destacaram. Por fim o Plantio Convencional possui os filos Proteobacteria e Verrucomicrobia como destaque entre os demais filos, com maior quantidade de organismos.

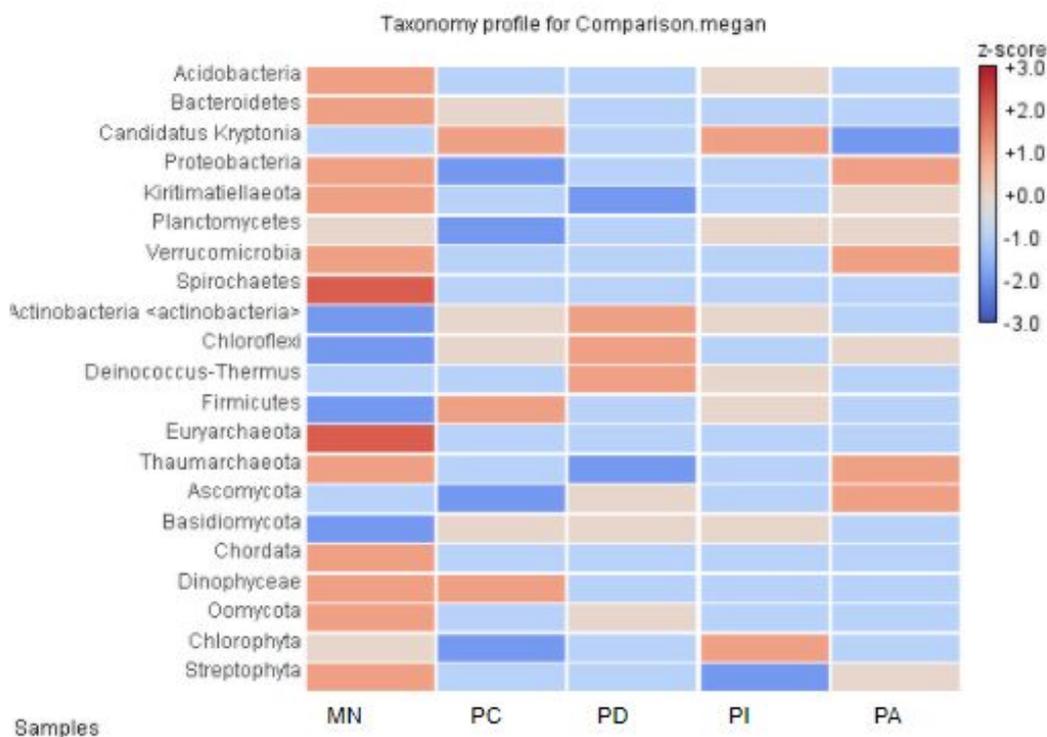


Figura 24. Heatmap gerado pelo programa MEGAN 6 a nível de filo. Solo 1 (Mata Nativa); Solo 2 (Pastagem Contínua); Solo 3 (Plantio Direto); Solo 4 (Integração Lavoura Pecuária); Solo 5 (Plantio Convencional) da enzima β -galactosidase

A **figura 25** exibe um dendrograma apresentando todos os filos em relação a cada amostra de solo de manejos agrícolas. Cada cor representa uma amostra de solo e a quantidade está dentro das colunas, com isso é possível verificar que o filo que possui mais organismos entre todos os solos é o filo de bactéria Firmicutes.

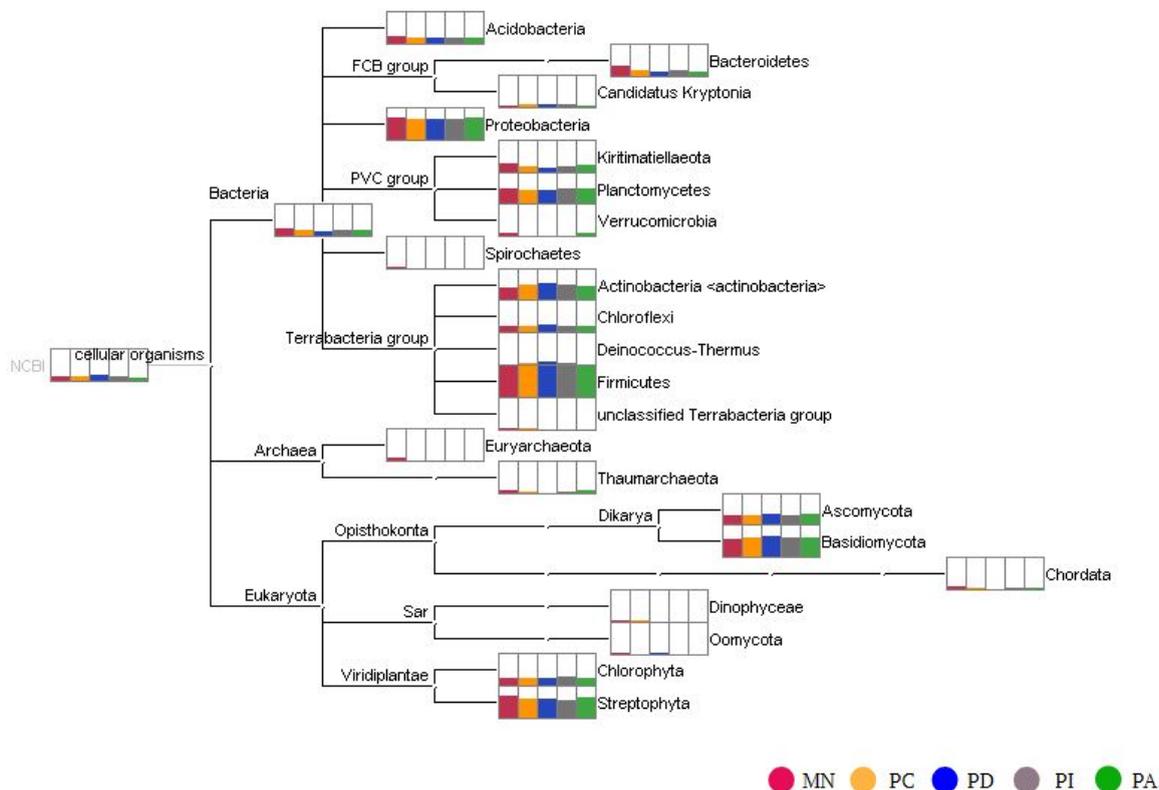


Figura 25. Dendrograma exibindo a nível de filo pertencentes a cada amostra de solo gerado pelo programa MEGAN 6 da enzima α -galactosidase nas amostras dos cinco manejos.

A **figura 26** exibe um diagrama de Venn, tendo os resultados a nível de espécie, relativo aos microrganismos que são comuns a todas as amostras e exclusivos de cada amostra. Todas as amostras de solos obtiveram microrganismos exclusivos, sendo na amostra de solo de Mata Nativa 34 microrganismos exclusivos. Na amostra de solo de Pastagem Contínua há 43 microrganismos exclusivos. Já na amostra de Plantio Direto possui 58 microrganismos exclusivos. A amostra de Pastagem Contínua se encontra com 25 microrganismos exclusivos, enquanto a amostra de solo de Integração Lavoura Pecuária possui 91 microrganismos exclusivos. Os microrganismos que já foram descritos e estudados como produtores da enzima β -galactosidase estarão nas tabelas posteriores, junto de uma

outra tabela apresentando os microrganismos que são comuns a todas as amostras que são em um total de 60 microrganismos.

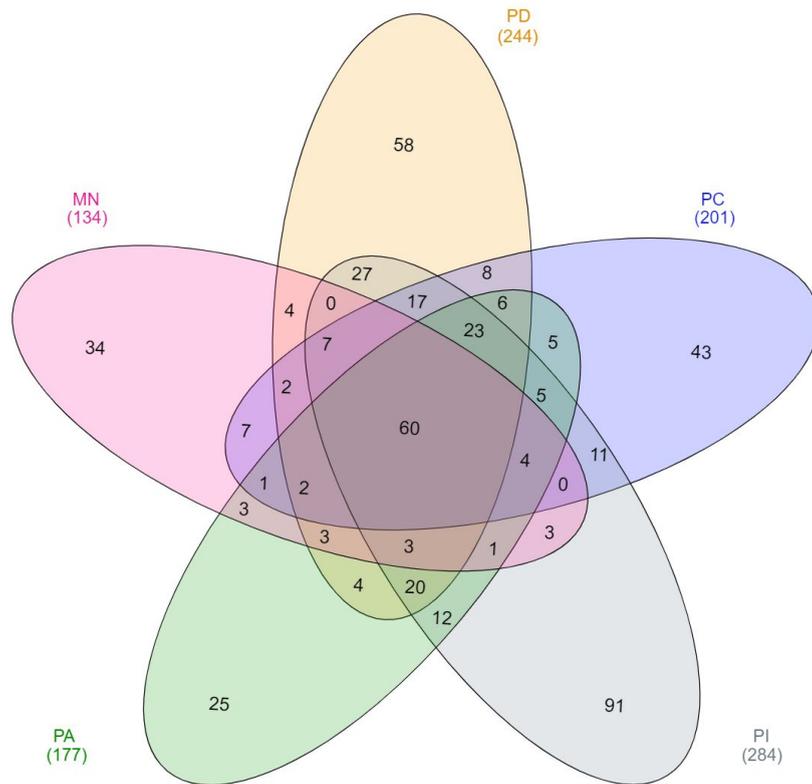


Figura 26. Diagrama de Venn relativo às espécies de microrganismos comuns a todas as amostras e exclusivos de cada amostra. MN (Mata Nativa); PD (Plantio Direto); PC (Pastagem Contínua); PA (Plantio Convencional); PI (Integração Lavoura Pecuária) da enzima β -galactosidase

A **tabela 9** abaixo mostra os microrganismos comuns presentes em todas as amostras de solo de manejos agrícolas, no qual oito foram descritos como produtor da enzima β -galactosidase. Assim como no resultado do diagrama de Venn da enzima α -galactosidase, existe uma discrepância muito elevada entre o número encontrados de sequências de DNA que codificam a enzima β -galactosidase e número de microrganismos encontrados neste resultado.

Tabela 9: Microrganismos a nível de espécie comum a todas as amostras de solos da enzima β -galactosidase

Domínio	Microrganismos	Descrito como produtor de α -galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Brucella abortus</i>	S	SIEIRA, 2004
	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	SAHAIKHAN et al., 2020
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	HUANG et al., 2020
	<i>Vibrio maritimus</i>	S	CHIMETTO et al., 2011
	<i>Clavibacter michiganensis</i>	S	OH et al., 2016
	<i>Streptomyces venezuelae</i>	S	CHATTERJEE et al., 1982
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	S	SINGH et al., 2014
Fungi	<i>Aspergillus niger</i>	S	WIDMER et al., 1979
Bacteria	<i>Candidatus Sulfolaludibacter sp. SbA4</i>	N	
	<i>Arcticibacter svalbardensis</i>	N	
	<i>Candidatus Kryptobacter tengchongensis</i>	N	
	<i>Brucella suis</i>	N	
	<i>Azospirillum brasilense</i>	N	
	<i>Methylophilus sp. TWE2</i>	N	
	<i>Archangium gephyra</i>	N	
	<i>Myxococcus stipitatus</i>	N	
	<i>Sorangium cellulosum</i>	N	
	<i>Glaciecola nitratireducens</i>	N	
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	N	
	<i>Serratia marcescens</i>	N	
	<i>Methylosarcina fibrata</i>	N	
	<i>Kiritimatiella glycovorans</i>	N	
	<i>Anaerohalosphaera lusitana</i>	N	
<i>Limnoglobus roseus</i>	N		
<i>Gemmataceae bacterium</i>	N		

Continuação: **Tabela 9:** Microrganismos a nível de espécie comum a todas as amostras de solos da enzima β -galactosidase

Bacteria	<i>Paludisphaera borealis</i>	N	
	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	N	
	<i>Bifidobacterium scardovii</i> JCM 12489 = DSM 13734	N	
	<i>Arthrobacter</i> sp. Hiyo8	N	
	<i>Streptomyces fradiae</i>	N	
	<i>Streptomyces</i> sp. ICC4	N	
	<i>Streptomyces</i> sp. L-9-10	N	
	<i>Streptomyces</i> sp. MMG1533	N	
	<i>Nonomuraea pusilla</i>	N	
	<i>Thermostaphylospora chromogena</i>	N	
	<i>Dictyobacter aurantiacus</i>	N	
	<i>Bacillus abyssalis</i>	N	
	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	N	
	<i>Marinilactibacillus piezotolerans</i>	N	
	<i>Streptococcus infantis</i>	N	
	<i>Streptococcus mitis</i>	N	
	<i>Streptococcus oralis</i>	N	
<i>Faecalitalea cylindroides</i>	N		
Fungi	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	N	
	<i>Cladophialophora immunda</i>	N	
	<i>Trichoderma gamsii</i>	N	
	<i>Trichoderma lentiforme</i>	N	
	<i>Fusarium proliferatum</i>	N	
	<i>Fusarium longipes</i>	N	
	<i>Tolypocladium capitatum</i>	N	
	<i>Tolypocladium paradoxum</i>	N	
<i>Ganoderma boninense</i>	N		

As figuras em diante apresentam os microrganismos exclusivos de cada amostra de solo de manejos agrícolas, na **tabela 10** irá apresentar o solo de Mata Nativa é possível verificar que de 34 microrganismos, apenas 15 foram descritos como produtor da enzima

β -galactosidase. A **tabela 11** irá mostrar a amostra de solo de manejo agrícola de Pastagem Contínua, no qual 32 foram descritos como produtor da enzima β -galactosidase. Já na **tabela 12** é possível notar que a amostra de solo de manejo agrícola de Plantio Direto retornou 21 microrganismos produtores da enzima β -galactosidase.

Tabela 10: Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Mata Nativa da enzima β -galactosidase

Domínio	Microrganismo	Descrito como β -galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Granulicella sp. WH15</i>	S	UNIPROT, 2020
	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i>	N	
	<i>Pyrinomonas methylaliphatogenes</i>	S	UNIPROT, 2015
	<i>Marinifilum fragile</i>	N	
	<i>Chitinophaga sp. SYP-B3965</i>	S	UNIPROT, 2020
	<i>Cyclobacterium qasimii</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Euzebyella marina</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Flavobacterium alvei</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Leeuwenhoekiella marinoflava</i>	N	
	<i>Leeuwenhoekiella palythoae</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Blastochloris viridis</i>	N	
	<i>Sphingopyxis sp. LC81</i>	N	
	<i>Burkholderia gladioli</i>	N	
	<i>Burkholderia sp. Bp9143</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Pandoraea sputorum</i>	N	
	<i>Methylobacillus flagellatus</i>	N	
	<i>Gilvimarinus chinensis</i>	N	
	<i>Type-D symbiont of Plautia stali</i>	N	
<i>Luteibacter yejuensis</i>	N		

Continuação: Tabela 10: Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Mata Nativa da enzima β -galactosidase

Bacteria	<i>Planctomycetes bacterium Pan181</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	N	
	<i>Candidatus Marispirochaeta associata</i>	N	
	<i>Rhodococcus sp. MTM3W5.2</i>	N	
	<i>Mycetocola reblochoni</i>	N	
	<i>Mycetocola zhadangensis</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Micromonospora coxensis</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Micromonospora sp. CB01531</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Actinosynnema pretiosum subsp. pretiosum</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Cohnella sp. M2MS4P-1</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Lachnospiraceae</i>	N	
Archaea	<i>Haloferax massiliensis</i>	S	UNIPROT, 2015
Fungi	<i>Verticillium dahliae</i>	N	

Tabela 11: Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Pastagem
Contínua da enzima β -galactosidase

Domínio	Microrganismo	Descrito como β -galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Kordia sp. SMS9</i>	N	
	<i>Solitalea koreensis</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Tardiphaga robiniae</i>	N	
	<i>Pacificimonas flava</i>	S	UNIPROT, 2013
	<i>Sphingobium sp. RAC03</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Derxia gummosa</i>	N	
	<i>Burkholderia lata</i>	N	
	<i>Paraburkholderia humisilvae</i>	S	UNIPROT, 2020
	<i>Thalassotalea euphylliae</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Enterobacter kobei</i>	S	UNIPROT, 2019

	<i>Raoultella terrigena</i>	N	
	<i>Edwardsiella hoshinae</i>	N	
	<i>Yersinia kristensenii</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Hahella sp. KA22</i>	N	
	<i>Pseudomonas sp. L13</i>	N	
	<i>Rhodopirellula maiorica SM1</i>	S	UNIPROT, 2013
	<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	S	UNIPROT, 2014
	<i>Catenulispora acidiphila</i>	S	BENESOVÁ, et al. 2010
	<i>Mycobacterium sp. MS1601</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Mycobacterium sp. Soil538</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Mycolicibacter sinensis</i>	N	
	<i>Mycolicibacterium canariasense</i>	N	
	<i>Mycolicibacterium parafortuitum</i>	N	
	<i>Haloactinopolyspora alba</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Cellulomonas gilvus</i>	N	
	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	S	TRUJILLO, et al. 2007
Bacteria	<i>Micromonospora sp. B006</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Pseudosporangium ferrugineum</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Actinopolymorpha singaporensis</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Nocardioides sp. GY 10127</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Auraticoccus monumenti</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Cutibacterium acnes JCM 18909</i>	S	UNIPROT, 2014
	<i>Tessaracoccus bendigoensis</i>	N	
	<i>Lechevalieria atacamensis</i>	N	
	<i>Saccharomonospora glauca</i>	N	

Continuação: **Tabela 11:** Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Pastagem Contínua da enzima β -galactosidase

Bacteria	<i>Saccharopolyspora dendranthemae</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Umezawaea tangerina</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Streptacidiphilus carbonis</i>	N	
	<i>Streptacidiphilus griseoplanus</i>	N	
	<i>Streptomyces humi</i>	N	
	<i>Streptomyces pathocidini</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. Root369</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Streptomyces sp. S8</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Actinobacteria bacterium</i>	N	
	<i>Actinobacteria bacterium YIM 96077</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Roseiflexus castenholzii DSM 13941</i>	N	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	S	JUAJUN, et al. 2010
	<i>Enterococcus ureasiticus</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	S	NIE, et al. 2013
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	S	UNIPROT, 2020
	<i>Clostridium chauvoei</i>	N	
	<i>Enterocloster bolteae</i>	S	UNIPROT, 2020
	<i>Roseburia faecis</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Lachnospiraceae bacterium FD2005</i>	N	
	<i>Halobacteroides halobius</i>	N	
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	N		
<i>Thermoanaerobacter wiegelii</i>	N		
Archaea	<i>Thermococcus barossii</i>	S	UNIPROT, 2018

Tabela 12: Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Plantio Direto da enzima β -galactosidase

Domínio	Microrganismo	Descrito como β-galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Granulicella tundricola</i>	N	
Bacteria	<i>Candidatus Sulfohalobium sp. SbA3</i>	N	
Bacteria	<i>Candidatus Symbiothrix dinenymphae</i>	N	
Bacteria	<i>Geofilum rubicundum</i>	N	
	<i>Ohtaekwangia koreensis</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Pedobacter sp. YR510</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Asticcacaulis biprosthecium</i>	N	
	<i>Bradyrhizobium sp. YR681</i>	N	
	<i>Cystobacter fuscus</i>	N	
	<i>Enterobacter sp. Ag1</i>	S	UNIPROT, 2012
	<i>Pseudomonas syringae pv. actinidiae</i>	N	
	<i>Xanthomonas codiae</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Bifidobacterium breve</i>	N	
	<i>Gordonia insulae</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Leifsonia xyli</i>	N	
	<i>Microbacterium testaceum</i>	N	
	<i>Actinoplanes brasiliensis</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Phytohabitans flavus</i>	S	UNIPROT, 2020
	<i>Phytohabitans rumicis</i>	N	
	<i>Nakamurella multipartita</i>	N	
	<i>Friedmanniella flava</i>	S	UNIPROT, 2017
<i>Friedmanniella sagamiharensis</i>	S	UNIPROT, 2017	
Bacteria	<i>Propionibacterium namnetense</i>	N	

Continuação: Tabela 12: Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Plantio Direto da enzima β -galactosidase

	<i>Lechevalieria deserti</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Pseudonocardia hierapolitana</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Saccharopolyspora flava</i>	N	
	<i>Streptomyces albulus</i>	S	UNIPROT, 2014
	<i>Microbispora hainanensis</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Microbispora sp. ATCC PTA-5024</i>	S	UNIPROT, 2014
	<i>Actinobacteria bacterium OK006</i>	S	UNIPROT, 2015
	<i>Bacillus indicus</i>	N	
	<i>Bacillus sp. TA-11</i>	S	UNIPROT, 1999
	<i>Parageobacillus genomosp. 1</i>	N	
	<i>Paenibacillus flagellatus</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Paenibacillus sp. Soil750</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Catabacter hongkongensis</i>	N	
	<i>Clostridium intestinale</i>	N	
	<i>Eubacterium rectale</i>	N	
	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	N	
	<i>Syntrophaceticus schinkii</i>	S	UNIPROT, 2015
	<i>Fervidobacterium thailandense</i>	S	UNIPROT, 2017
Archaea	<i>Natronoarchaeum philippinense</i>	S	UNIPROT, 2017
Fungi	<i>Neopestalotiopsis sp. 37M</i>	N	

A **tabela 13** irá apresentar a amostra de solo de manejo agrícola de Integração Lavoura Pecuária, nota-se que 49 microrganismos foram descritos através do site Uniprot.org. Sendo a amostra de solo que teve maior número de microrganismos descritos. Já na tabela 14, a amostra de solo de manejo agrícola de Plantio Convencional mostra que oito microrganismos foram descritos como produtor da enzima β -galactosidase.

Tabela 13: Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Integração Lavoura Pecuária da enzima β -galactosidase

Domínio	Microrganismo	Descrito como β -galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Edaphobacter aggregans</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	N	
	<i>Prevotella sp. oral taxon 473 str. F0040</i>	S	UNIPROT, 2013
	<i>Prevotellaceae bacterium HUN156</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Parabacteroides bouchesdurhonensis</i>	N	
	<i>Prolixibacteraceae bacterium WC007</i>	N	
	<i>Filimonas endophytica</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	N	
	<i>Runella sp. SP2</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Cytophagaceae bacterium SJW1-29</i>	N	
	<i>Arenibacter aquaticus</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Capnocytophaga sp. H4358</i>	N	
	<i>Gelidibacter japonicus</i>	N	
	<i>Zunongwangia mangrovi</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Marteleva endophytica</i>	S	UNIPROT, 2015
	<i>Candidatus Burkholderia humilis</i>	N	
	<i>Pelomonas sp. Root1444</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Duganella sp. Leaf61</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Janthinobacterium sp. CG23_2</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Massilia timonae</i>	S	UNIPROT, 2017
<i>Massilia umbonata</i>	S	UNIPROT, 2019	
<i>Massilia sp. GV090</i>	S	UNIPROT, 2019	
<i>Massilia sp. LC238</i>	S	UNIPROT, 2014	
<i>Sapientia aquatica</i>	S	UNIPROT, 2019	
Bacteria	<i>Vitiosangium sp. GDMCC 1.1324</i>	S	UNIPROT, 2018

Continuação: **Tabela 13:** Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo
Integração Lavoura Pecuária da enzima β -galactosidase

Bacteria	<i>Corallococcus exiguus</i>	N	
	<i>Corallococcus sp. AB045</i>	N	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	N	
	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	S	UNIPROT, 2015
	<i>Psychrobacter sp. FME2</i>	N	
	<i>unclassified Pseudomonas</i>	N	
	<i>Vibrio renipiscarius</i>	S	UNIPROT, 2015
	<i>Xanthomonas prunicola</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Aquisphaera giovannonii</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Rhodopirellula sp. SWK7</i>	S	UNIPROT, 2013
	<i>Thermobispora bispora</i>	N	
	<i>Actinomyces sp. oral taxon 897</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Corynebacterium glaucum</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Mycobacterium sp. JS623</i>	S	UNIPROT, 2013
	<i>Mycobacterium sp. Root265</i>	N	
	<i>Mycobacterium sp. SWH-M1</i>	N	
	Bacteria	<i>Rhodococcus sp. X156</i>	N
<i>unclassified Glycomyces</i>		N	
<i>Cellulomonas sp. WB94</i>		N	
<i>Serinicoccus hydrothermalis</i>		S	UNIPROT, 2013
<i>Frigoribacterium sp. JB110</i>		S	UNIPROT, 2017
<i>Microbacterium sediminis</i>		S	UNIPROT, 2019
<i>Arthrobacter sp. OY3WO11</i>		S	UNIPROT, 2016
<i>Actinoplanes xinjiangensis</i>		S	UNIPROT, 2018
<i>Actinoplanes sp. N902-109</i>		S	UNIPROT, 2013
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>		S	UNIPROT, 2016
<i>Micromonospora sp. MP36</i>		S	UNIPROT, 2019
<i>Kribbella flavida</i>	N		
<i>unclassified Kribbella</i>	N		

Bacteria	<i>Tessaracoccus bendigoensis</i> DSM 12906	S	UNIPROT, 2015

Continuação: **Tabela 13:** Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Integração Lavoura Pecuária da enzima β -galactosidase

	<i>Tessaracoccus sp. ZS01</i>	S	UNIPROT, 2017
Bacteria	<i>Actinoalloteichus hoggarensis</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Amycolatopsis bartoniae</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	N	
	<i>Lentzea violacea</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Pseudonocardia oroxyli</i>	N	
	<i>Streptomyces afghaniensis</i>	N	
	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Streptomyces lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i>	N	
	<i>Streptomyces puniscabiei</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Streptomyces sp. FXJ1.172</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Streptomyces sp. H-KF8</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Actinomadura parvosata</i> subsp. <i>kistnae</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Thermomonospora</i>	N	
	<i>Conexibacter woesei</i>	N	
	<i>Litorilinea aerophila</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Chloroflexus aggregans</i>	N	
Bacteria	<i>Chloroflexia bacterium</i> SDU3-3	N	
	<i>Leptolyngbya sp. Heron</i> Island J	N	
	<i>Deinococcus aerius</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	N	

Continuação: **Tabela 13:** Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo
Integração Lavoura Pecuária da enzima β -galactosidase

	<i>Bacillus sp. KH172YL63</i>	N	
	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	N	
	<i>Paenibacillus senegalensis</i>	N	
	<i>Paenibacillus sp. N3.4</i>	N	
	<i>Leuconostoc suionicum</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>	N	
	<i>Pseudoclostridium thermosuccinogenes</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Lachnoclostridium sp. An181</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Halanaerobium</i>	N	
	<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i>	N	
Archaea	<i>bacterium 1XD21-13</i>	N	
Fungi	<i>Cuniculiplasma divulgatum</i>	S	UNIPROT, 2017
Fungi	<i>Aspergillus flavus NRRL3357</i>	N	
	<i>Trichoderma guizhouense</i>	S	UNIPROT, 2017

Tabela 14: Microrganismos a nível de espécie exclusivos a amostra de solo Plantio Convencional da enzima β -galactosidase

Domínio	Microrganismo	Descrito como β -galactosidase	Referências
Bacteria	<i>Chitinophaga rupis</i>	S	UNIPROT, 2017
	<i>Croceivirga radialis</i>	N	
	<i>Flavobacterium sp. IMCC34758</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>unclassified Bradyrhizobium</i>	N	
	<i>Devosia sp. CM5-1</i>	N	
	<i>Pandoraea aquatica</i>	N	
	<i>unclassified Duganella</i>	N	
Bacteria	<i>Pseudomonas saudiphocaensis</i>	N	
	<i>Opitutaceae bacterium TAV5</i>	S	UNIPROT, 2014
	<i>Mycolicibacterium flavescens</i>	N	
	<i>Microbacterium yannicii</i>	N	
	<i>Micromonospora noduli</i>	S	UNIPROT, 2018
	<i>Micromonospora sp. AMSO12t</i>	N	
	<i>Streptomyces sp. SAJ15</i>	N	
	<i>Euzebya rosea</i>	N	
	<i>Chloroflexus islandicus</i>	S	UNIPROT, 2016
	<i>Chloroflexales bacterium ZM16-3</i>	N	
	<i>Dictyobacter alpinus</i>	S	UNIPROT, 2019
	<i>Desertifilum sp. IPPAS B-1220</i>	N	
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	N	
	<i>Blautia</i>	N	
<i>Roseburia</i>	N		
Archaea	<i>Halegenticoccus soli</i>	N	
Archaea	<i>Thermococcus radiotolerans</i>	S	UNIPROT, 2018
Fungi	<i>Fusarium oxysporum f. sp. narcissi</i>	S	UNIPROT, 2019

Os resultados do diagrama de Venn, mostram que mesmo que a enzima α -galactosidase tenha uma quantidade superior de sequências de DNA que codificam a enzima, seus resultados indicam que a maior parte dessas sequências eram repetidas, enquanto a enzima β -galactosidase, mesmo tendo um número discrepante entre os dados de sequências de DNA e os resultados do diagrama de Venn, nota-se que o mesmo possui maior diversidade de microrganismos em comparação a enzima α -galactosidase.

6.2.1 INFERÊNCIAS ESTATÍSTICAS DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE

No programa STAMP foram realizadas as análises estatísticas. Tendo as comparações feitas em pares a nível de filo, ou seja, comparando uma amostra com outra até que todas fossem comparadas. Em parâmetros com diferenças estatísticas com significância de 95%. Primeiramente foi comparado a amostra de solo sob mata nativa com todas as outras amostras. Na **figura 27** se encontra a primeira comparação de análise estatística, sendo ela por Mata Nativa e Pastagem Contínua, é possível notar que o filo Basidiomycota possui diferença estatística significativa, ocorrendo mais em Pastagem Contínua enquanto o filo Bacteroidetes possui maior ocorrência na amostra de solo de Mata Nativa.

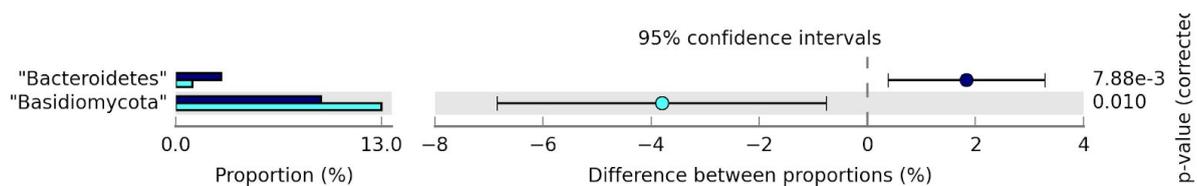


Figura 27. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação à pastagem contínua. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Pastagem contínua.

Na comparação entre Mata Nativa e Plantio Direto, como está sendo comparado mata nativa com as outras amostras o resultado se repete, sendo que o filo Basidiomycota possui diferença estatística significativa. Na **figura 28** nota-se que o gráfico de proporções indica o microrganismo de filo Streptophyta possui diferença significativa, ocorrendo em maior abundância na amostra de Mata Nativa, enquanto o filo de fungos Basidiomycota ocorre mais em Integração Lavoura Pecuária.

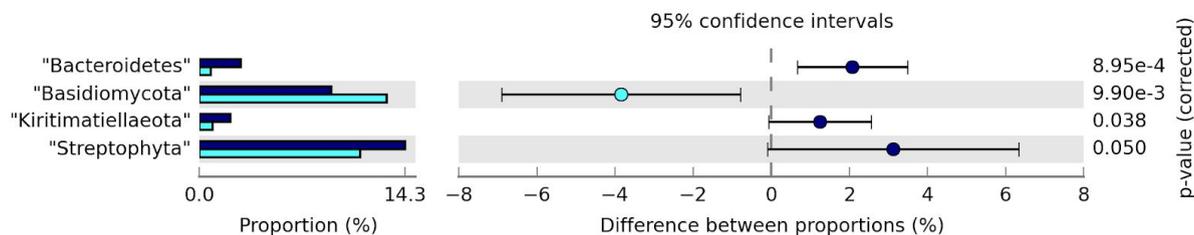


Figura 28. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação a integração lavoura pecuária. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Integração Lavoura Pecuária.

Na **figura 29** o filo Bacteroidetes foi o único que obteve maior diferença estatística significativa, ocorrendo mais em Mata Nativa.

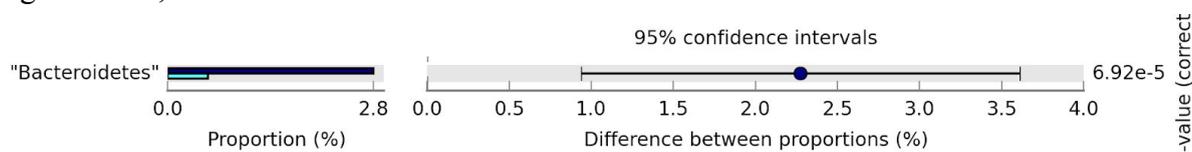


Figura 29. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra mata nativa em relação a plantio convencional. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Plantio Convencional.

Na segunda etapa de análises estatísticas, a amostra de solo de Pastagem Contínua é comparada com Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional. Na comparação de Pastagem Contínua não foram retornados resultados, mas isso não significa que não exista, mas sim que diante aos parâmetros do programa STAMP, não foi possível identificar o resultado dessa comparação. Na **figura 30** apenas um microrganismos retornou resultados com diferença estatística significativa, ocorrendo em maior abundância na amostra de Integração Lavoura Pecuária.

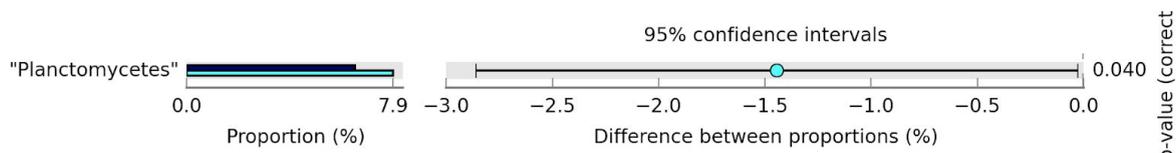


Figura 30. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra pastagem contínua em relação a integração lavoura pecuária. Azul escuro: Pastagem Contínua; Azul claro: Integração Lavoura Pecuária.

Na comparação de Pastagem Contínua e Plantio Convencional e também entre a comparação de Plantio Direto e Integração Lavoura Pecuária não foram retornados resultados de diferenças estatísticas significativas, ocorrendo isso diante dos parâmetros do programa STAMP. Na **figura 31** tanto o filo Bacteroidetes e o filo Thaumarchaeota possuíram diferença estatística significativa, ocorrendo em maior abundância na amostra de solo de Plantio Convencional.

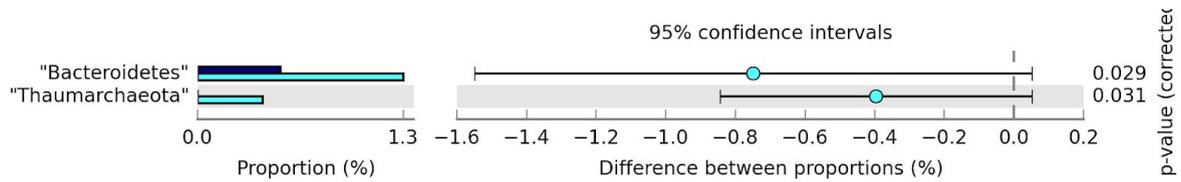


Figura 31. Abundância de microrganismos produtores de β -galactosidase a nível de filo da amostra plantio direto em relação a plantio convencional. Azul escuro: Plantio Direto; Azul claro: Plantio Convencional.

7. CONCLUSÕES

Foi possível identificar sequências responsáveis pelas duas enzimas em todas as amostras de solos, sendo um total de 59010 sequências de DNA contendo a informação relativa a enzima α -galactosidase e 12298 sequências contendo a informação relativa a β -galactosidase;

Quanto a taxonomia os maiores representantes das sequências de DNA contendo a informação relativa a β -galactosidase foram os filos de bactérias: Acidobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Spirochaetes; os filos de archaeas: Euryarchaeota e Thaumarchaeota; e o filo de plantas Streptophyta.

Os maiores representantes da taxonomia relativa às sequências de DNA responsáveis pela codificação de α -galactosidase foram: as bactérias Candidatus Berkelbacteria, Candidatus Kerfeldbacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospinae; as archaeas: Candidatus Altiaarcheota, Euryarcheota.

Foi possível verificar que os diferentes tipos de manejos de solos exibiram variações estatisticamente significantes na proporção de microrganismos produtores de α -galactosidase e β -galactosidase.

Todas as amostras de solos que retornaram resultados obtiveram diferença estatística significativa, sendo na enzima α -galactosidase e β -galactosidase. Assim é possível ignorar a hipótese H0 e aceitar a hipótese H1.

8. REFERÊNCIAS

ABURTO, C. , CASTILHO, C. , CORNEJO, F. et al., **β -Galactosidase from *Exiguobacterium acetylicum*: Cloning, expression, purification and characterization**, *Bioresource Technology*, Volume 277, 2019, Pages 211-215, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.005>.

ALCÂNTARA, A. M. Estudo das propriedades bioquímicas e cinéticas da enzima α -galactosidase do fungo *Acremonium zeae* 2018. Monografia - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei.

ÁLVAREZ, M. C. M., SISO, M. et al., **Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* α -galactosidase production and application in the degradation of raffinose family oligosaccharides**. *Microb Cell Fact* 18, 172 (2019) doi:10.1186/s12934-019-1222-x <<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1222-x>>

AULITTO, M; FUSCO, S; FIORENTINO, G. ; LIMAURO, D. et al., *Thermus thermophilus* as source of thermozymes for biotechnological applications: homologous expression and biochemical characterization of an α -galactosidase. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], ano 2017, v. 16, n. 28, 2017.

AWASTHI, M. K; RAVINDRAN, B.; SARSAIYA, S; CHEN; et al., Metagenomics for taxonomy profiling: tools and approaches. **Bioengineered**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 356-374, 2020.

BREITWIESER, F. P, LU, J. SALZBERG L S., **A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly**, *Briefings in Bioinformatics* , Volume 20, Issue 4, July 2019, Pages 1125–1136, <https://doi.org/10.1093 / bib / bbx120>

BHATIA, S; SINGH, A; BATRA, N; SINGH, J. Microbial production and biotechnological applications of α -galactosidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 150, p. 1294-1313, 1 maio 2020.

BANERJEE, R; KUMAR, G V; KUMAR, J. **OMICS-Based Approaches in Plant Biotechnology**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2019. p. 1-346.

BATTISTA, J. R. *Deinococcus–Thermus* Group. **ELS**, Louisiana State University and A & M College, Baton Rouge, Louisiana, USA, 15 jul. 2016.

CHAITANYA, KV. (2019) **Other 'Omics' integrated into biosciences**. In: **Genome and Genomics**. Springer, Cingapura. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0702-1_7

CHEN, K; PACHTER, L. Bioinformatics for Whole-Genome Shotgun Sequencing of Microbial Communities. **PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY**, [s. l.], 12 jul. 2005. (<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010024> metagenomica wgs)

DANIEL, R. THE METAGENOMICS OF SOIL. **Nature Reviews Microbiology**, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität, Grisebachstrasse 8, 37077 Göttingen, Germany, junho 2005.

DONG W., LIU E., YAN C. et al., Impact of no tillage vs. conventional tillage on the soil bacterial community structure in a winter wheat cropping succession in northern China. *European Journal of Soil Biology*. v. 80, p 35-42, 2017.

DONOVAN H. P, GENE W. T, HUGENHOLTZ, P. et al., STAMP: análise estatística de perfis taxonômicos e funcionais, *Bioinformática* , Volume 30, Edição 21, 1 de novembro de 2014, Páginas 3123-3124, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>

EKBLOM, R; WOLF, J B. W. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. **Evolutionary Applications**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 1026-1042, novembro 2014.

FOROUTAN, M. , GHAFFARIFAR, F. , SHARIFI, Z. , et al., **Bioinformatics analysis of ROO protein to improve vaccine design against Toxoplasma gondii** *Infect. Genet. Evol.*, 62 (2018), pp. 193-204

GALEN, S C.; BORNER, J; WILLIAMSON, J L.; et al., **Metatranscriptomics yields new genomic resources and sensitive detection of infections for diverse blood parasites.** *Molecular Ecology Resources*, [s. l.], v. 20, ed. 1, 11 set. 2019.

GEZAF, S A; MAHAS, H. H. A; ABDEL, A. A M. Rhizosphere Microbiomes and Their Potential Role in Increasing Soil Fertility and Crop Productivity. **Current Trends in Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture**, [s. l.], p. 183-201, 2020.

GUERRERO, C. VERA, C. CONEJEROS, R. et al., **Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates**, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 70, 2015, Pages 9-17, ISSN 0141-0229, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>.

GYAWALI R, OYENIRAN A, ZIMMERMAN, T. et al., (2020). **A comparative study of extraction techniques for maximum recovery of β -galactosidase from the yogurt bacterium *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus***. *Journal of Dairy Research* 87, 123–126. <https://doi.org/10.1017/S0022029919001031>

HEMMAT, J. ; SAFARI, S; CHE, R; et al., Toxic trace element resistance genes and systems identified using the shotgun metagenomics approach in an Iranian mine soil. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], 2020.

IAREMA, B. G. **BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ALFA-GALACTOSIDASE UTILIZANDO VINHAÇA DE SOJA COMO SUBPRODUTO/RESÍDUO INDUSTRIAL** 2015. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ISHIGURO, M; KANEKO, S; KUNO, A; et al., Purification and Characterization of the Recombinant *Thermus* sp. Strain T2 α -Galactosidase Expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, [s. l.], abril 2001.

SEHNAL, D. ROSE, A. S. KOVCA, J. et al., (2018) Mol*: Images created using Mol* should cite the PDB ID, the corresponding structure publication, Mol* Towards a common library and tools for web molecular graphics MolVA/EuroVis Proceedings. doi:10.2312/molva.20181103), and RCSB PDB.

KRAUT, C. J. ZOLTI, A. SHALTIEL H. L, et al., **Effects of tillage practices on soil microbiome and agricultural parameters**. *Sci Total Environ*. 2020 Feb 25;705:135791. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135791. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31810706.

KRAUT, C. ZOLTI, J. A.; SHALTIEL, H. L; ARGAMAN, E; et al., Effects of tillage practices on soil microbiome and agricultural parameters. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 705, 20 fev. 2020.

LEBLANC JG, SILVESTRONI A, CONNES C, et al., **Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase**. *Genet Mol Res* 3:432–440, 2004.

LOPES, O. M. N. **Práticas de manejo do solo para produção agrícola familiar** / por Otávio Manoel Nunes Lopes e Ruy Rangel Galeão.- Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006 23p. : il. ; 21cm (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 235).

MADHAVAN A; SINDHU R.; PARAMESWARAN B.; et al.,. Metagenome Analysis: a Powerful Tool for Enzyme Bioprospecting. *ApplBiochem Biotechnol*, v. 183, p 636–651. 2017.

MARUYAMA, C. R; BILESKY, J. N; LIMA, R; et al.,. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], 25 mar. 2020. (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00225/full#refer1> (MARUYAMA; Rodrigues, C. 2020))

MATTHEWS, B. W. (2005). **The structure of *E. coli* β -galactosidase**. *Comptes Rendus Biologies*, 328(6), 549–556. doi:10.1016/j.crv.2005.03.006

NANNIPIERI, P. ASCHER, J. CECCHERINI, M. T, et al., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci*. 54:655-670.

OGWU, M C; SRINIVASAN, S; DONG, K; et al., Community Ecology of *Deinococcus* in Irradiated Soil. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 78, p. 855–872, 2019.

PARKS, D. H.; TYSON, G. W.; HUGENHOLTZ, P; et al., STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 30, n. 21, p. 3123–3124, novembro 2014.

PARMJIT, S. KUMARI, S. et al.. 2010. **Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries**. Enzyme Research Volume 2010, Article ID 473137, 16 pages <http://dx.doi.org/10.4061/2010/473137>

PENG, Y. et al., IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, v. 28, n. 11, p. 1420-1428, 2012

RICO, D. A. ÁLVAREZ, C.M. ESCUDER, R. J. et al., **Rational mutagenesis by engineering disulphide bonds improves *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase for high-temperature industrial applications**. *Sci Rep* 7, 45535 (2017) <<https://doi.org/10.1038/srep45535>>

SAQIB, S., AKRAM, A., HALIM, S. A. et al., (2017). **Sources of β -galactosidase and its applications in food industry**. *3 Biotech*, 7(1). doi:10.1007/s13205-017-0645-5

SIEIRA, R., COMERCI, D. J., PIETRASANTA, L. I., et al., (2004). **Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon**. *Molecular Microbiology*, 54(3), 808–822. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04316.x

SILVA, M. R. SARTORI, S.; CASTRO, A. P; KRÜGER, R. H; et al., Soil bacterial communities in the Brazilian Cerrado: Response to vegetation type and management. *Acta Oecologica*, [s. l.], v. 100, outubro 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.103463>

SOUZA, R C; CANTÃO, M. E; NOGUEIRA, M A; et al., Outstanding impact of soil tillage on the abundance of soil hydrolases revealed by a metagenomic approach. *Brazilian Journal of Microbiology*, [s. l.], v. 49, p. 723-730, outubro de 2018.

SOUZA, R C; HUNGRIA, M; CANTÃO, M. E; et al., Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. *Applied Soil Ecology*, [s. l.], v. 86, p. 106-112, fevereiro 2015.

TERRÓN, G. L; SANTERO, O. G. A. E. **METAGENOMICS METHODS, APPLICATIONS AND PERSPECTIVES: POTENTIAL AND LIMITATIONS OF METAGENOMIC FUNCTIONAL ANALYSES**. [S.l.: s.n.], 2014. p. 1-205.

TURNER, T. R., RAMAKRISHNAN, K., WALSHAW, J., et al.,(2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal*, 7, 2248–2258. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.119>

WANG, Y., ZHOU, Y., XIAO, X., et al., (2020). **Metaproteomics: A strategy to study the taxonomy and functionality of the gut microbiota**. *Journal of Proteomics*, 103737. doi:10.1016/j.jprot.2020.103737

WANG, Y; ZHOU, Y; XIAO, X; et al.,. Metaproteomics: A strategy to study the taxonomy and functionality of the gut microbiota. *Journal of Proteomics*, [s. l.], v. 219, 20 maio 2020.

HUA, Y. ZHUC, M. TIAND, G. et al., Tzi Bun Ngf. **Isolation of a protease-resistant and pH-stable β -galactosidase displaying hydrolytic efficacy toward raffinose family oligosaccharides from the button mushroom *Agaricus bisporus*.** Acesso 2019, disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016320669>>