

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

MATEUS BARBOSA GUIMARÃES

**Bioprospecção *in silico* de genes codificadores de L-
aspariginase em amostras de solo de Dourados-MS**

DOURADOS, 2021

MATEUS BARBOSA GUIMARÃES

Bioprospecção *in silico* de genes codificadores de L-aspariginase em amostras de solo de Dourados-MS

Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado para obtenção do título de bacharel no curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira.

Área de concentração: Genética Molecular e de Microorganismos.

DOURADOS, 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G963b Guimarães, Mateus Barbosa
Bioprospecção in silico de genes codificadores de
L-aspariginase em amostras de solo de Dourados-
MS [recurso eletrônico] / Mateus Barbosa
Guimarães. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Matheus Pereira.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-
Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UEGD

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.

MATEUS BARBOSA GUIMARÃES

Bioprospecção *in silico* de genes codificadores de L-aspariginase em amostras de solo de Dourados-MS

Trabalho de Conclusão do Curso, aprovado pela banca examinadora para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira.

Dourados, 26 de novembro de 2021.

Banca Examinadora



Profa. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá - FCBA



Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite - FCBA



Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira - FCBA

Resumo

A enzima L-asparaginase possui grande importância industrial. Na indústria farmacêutica é aplicada ao tratamento de LLA (Leucemia Linfoblástica Aguda), pois devido a mutações, as células cancerígenas perdem a capacidade de sintetizar sua própria asparagina. Na indústria alimentícia a enzima é aplicada ao tratamento de alimentos para evitar a formação de acrilamida em alimentos ricos em carboidratos. As L-asparaginases comerciais possuem efeitos tóxicos imunogênicos como hipertensão e pancreatite, por isso a busca por novas enzimas com melhores atividades de bioconversão e menor toxicidade são de suma importância. A aplicação da técnica de metagenômica em amostras ambientais como de solo permite estudar novas proteínas sem a necessidade do cultivo de microrganismos em laboratório. O trabalho visou comparar a diversidade e abundância da microbiota produtora da enzima L-asparaginase em amostras de solo da região de Dourados, MS. Foram utilizados as ORFs originadas do NGS pelo método shotgun para alinhamento local com banco de dados formatado com sequências da enzima. Os resultados foram analisados nos softwares Megan, Stamp, Interacti Venn. Foi selecionada uma enzima candidata para realização da modelagem, visualização e características físico-químicas. Os resultados retornaram um total de 13 filos distintos, sendo 4 eucariotos, 2 arqueias e 7 bactérias. Em relação às espécies, a amostra de solo de mata nativa apresentou 18 que ocorreram exclusivamente, enquanto o solo de integração lavoura-pecuária apresentou 12, pastagem contínua 8, plantio convencional 6 e plantio direto 12. A modelagem da proteína apresentou uma confiança de 95.9% de acordo com o software Phyre 2. O solo de mata nativa apresentou maior abundância e riqueza que os demais quanto aos microrganismos que possuem genes codificantes para a enzima L-asparaginase.

Palavras-chave: Bioinformática; enzima; metagenômica

ABSTRACT

The L-asparaginase enzyme is of great industrial importance. In the pharmaceutical industry, it is applied to the treatment of ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia), because, due to mutations, cancer cells lose the ability to synthesize their own asparagine. In the food industry, the enzyme is applied to food treatment to prevent the formation of acrylamide in carbohydrate-rich foods. Commercial L-asparaginases have immunogenic toxic effects such as hypertension and pancreatitis, so the search for new enzymes with better bioconversion activities and less toxicity is of paramount importance. The application of the metagenomics technique in environmental samples such as soil allows the study of new proteins without the need to cultivate microorganisms in the laboratory. The work aimed to compare the diversity and abundance of the L-asparaginase enzyme-producing microbiota in soil samples from the region of Dourados, MS. The ORFs originated from the NGS by the shotgun method were used for local alignment with a database formatted with enzyme sequences. The results were analyzed using Megan, Stamp, Interacti Venn software. A candidate enzyme was selected to perform the modeling, visualization and physicochemical characteristics. The results returned a total of 13 distinct phyla, 4 eukaryotes, 2 archaea and 7 bacteria. Regarding species, the native forest soil sample had 18 that occurred exclusively, while the integrated crop-livestock soil had 12, continuous pasture 8, conventional planting 6 and no-tillage 12. The protein modeling showed a confidence of 95.9 % according to Phyre 2 software. The native forest soil showed greater abundance and richness than the others in terms of microorganisms that have genes encoding the L-asparaginase enzyme.

Keywords: Bioinformatics; enzyme; metagenomics

Sumário

1. Introdução	12
2. Hipóteses	12
3. Objetivos	13
4. Revisão Bibliográfica	13
5. Materiais e Métodos	19
6. Resultados e discussão	21
7. Conclusões	45
Referências Bibliográficas	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação de bioconversão da enzima L-asparaginase.

Figura 2. Fluxograma das atividades de bioinformática desenvolvidas no presente trabalho.

Figura 3. Curva de rarefação das 5 amostras de solo realizada no software Megan.

Figura 4. Cladograma dos filios produtores da enzima L- asparaginase nas 5 amostras de solo.

Figura 5. Cladograma dos gêneros produtores da enzima L- asparaginase nas 5 amostras de solo.

Figura 6. Heatmap a nível de filo das 5 amostras de solo realizada no software Megan.

Figura 7. Heatmap a nível de gênero das 5 amostras de solo realizada no software Megan.

Figura 8. Gráfico de co-ocorrência positiva dos filios produtores da enzima L- asparaginase.

Figura 9. Gráfico de co-ocorrência positiva e negativa dos filios produtores da enzima L- asparaginase.

Figura 10. Gráfico de co-ocorrência positiva dos gêneros produtores da enzima L- asparaginase.

Figura 11. Gráfico de co-ocorrência positiva e negativa dos gêneros produtores da enzima L- asparaginase.

Figura 12. Gráfico de interação das espécies produtores da enzima L- asparaginase nas 5 amostras de solo.

Figura 13. Análise estatística comparando os solos de mata nativa e pastagem contínua.

Figura 14. Análise estatística comparando os solos de mata nativa e plantio direto.

Figura 15. Análise estatística comparando os solos de mata nativa e integração lavoura-pecuária.

Figura 16. Análise estatística comparando os solos de mata nativa e plantio convencional.

Figura 17. Análise estatística comparando os solos de pastagem contínua e plantio direto.

Figura 18. Análise estatística comparando os solos de pastagem contínua e plantio convencional.

Figura 19. Análise estatística comparando os solos de plantio direto e plantio convencional.

Figura 20. Visualização da modelagem da proteína L-asparaginase produzida pelo microrganismo *Friedmanniella luteola* realizada pelo programa Phyre2 exibida no programa EzMol no modelo de nuvem de elétrons.

Figura 21. Visualização da modelagem da proteína L-asparaginase produzido pelo microrganismo *Friedmanniella luteola* realizada pelo programa Phyre2 exibida no programa EzMol no modelo cartoon.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidade de sequências de L-asparaginase e ORFs entre as 5 amostras de solos com dados não normalizados.

Tabela 2. Índices de diversidade das 5 amostras de solo obtidos no software Megan.

Tabela 3. Lista de espécies presentes exclusivamente em cada amostra de solo e as que são comum a todas amostras de solo.

Tabela 4. Resultado dos valores obtidos no software ProtParam]

LISTA DE ABREVIações

pH – Ponto hidrogeniônico
WGS - Whole Genome Sequence
NCBI – National Center for Biotechnology Information
DNA – Ácido desoxirribonucleico
NGS – Next Generation Sequencing
Blast – Basic Local Alignment Search Tool
ORF - Open Read Frame
OTU - Operational Taxonomic Unit
pI – Ponto isoeletrico
II – Índice de instabilidade
IA – Índice alifático
GRAVY - Grand average of hydropathy
CE – Coeficiente de extinção
PM – Peso molecular

1. Introdução

As enzimas são importantes catalisadores biológicos encontrados em animais, plantas e microrganismos. São responsáveis por acelerar reações químicas lentas e complexas. Devido sua ubiquidade e variedade, as enzimas representam uma importante fonte de recursos biológicos para aplicações nas mais diversas indústrias, tais como farmacêuticas, alimentícias, têxteis, entre outras. O mercado enzimático se iniciou no século XIX e, desde então, cresce continuamente (Wiltschi, 2020, Robinson, 2015).

Devido a abundância microbiana, os microrganismos representam a maior variedade biológica, estando presente em diversos ambientes distintos que moldam suas características biológicas. Metodologias tradicionais para prospecção de novas enzimas envolvem, principalmente, a necessidade de cultivo de microrganismos em laboratório, porém estima-se que cerca de 99% dos microrganismos não sejam cultiváveis, gerando assim uma grande limitação para os métodos convencionais (Wiltschi, 2020).

Com o avanço da tecnologia, novas metodologias para prospecção de enzimas foram desenvolvidas. A metagenômica consiste no sequenciamento do material genético total presente na amostra sem a necessidade de cultivo, com isso, abrangendo uma maior variedade que as metodologias tradicionais (Gosh, 2018).

Devido à quantidade de dados que um experimento de metagenômica gera, o uso de softwares para análise dos dados se faz necessário. As análises de bioinformática consistem desde o tratamento dos dados após o sequenciamento até a anotação funcional dos genes. Alguns programas como Blast, Megan e Stamp são utilizados neste processo (Junemann, 2017).

Uma enzima de grande importância medicinal e farmacêutica é a L-asparaginase. Ela é uma hidrolase responsável por transformar a L-asparagina em ácido aspártico e amônia. Esta enzima é utilizada para o tratamento de câncer, mais especificamente Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), que se caracteriza pela proliferação de células linfoides defeituosas (Chand, 2020).

Devido à toxicidade e efeitos colaterais, como hipertensão e pancreatite causadas devido ao efeito imunogênico da molécula microbiana, poucas L-asparaginases possuem seu uso clínico permitido. As mais utilizadas são as provindas de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. Os microrganismos são a maior fonte de descoberta de novas L-asparaginase (Cachumba, 2016). Trabalhos recentes buscam novas variantes da enzima L-asparaginase promissoras para aplicação medicinal através de análise metagenômica (Arjun; 2017, Sobat, 2021).

2. Hipóteses

H0: Não há diferença estatística significativa em relação a presença de genes codificantes da enzima L-asparaginase entre as amostras de solo referentes aos diferentes manejos agrícolas.

H1: Pelo menos uma das amostras de solo apresentam diferenças estatísticas significantes de genes codificantes para a enzima L-asparaginase entre as amostras de solo referentes aos diferentes manejos agrícolas.

3. Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Analisar a ocorrência dos genes que codificam a enzima L-asparaginase nas amostras de solo sob diferentes manejos agrícolas e mata nativa.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os microrganismos produtores de L- asparaginase em cada amostra de solo.
- Identificar taxonomicamente os microrganismos produtores de L- asparaginase em cada amostra de solo.
- Analisar se ocorrem diferenças estatísticas na microbiota produtora de L- asparaginase entre as amostras de solo de diferentes tipos de manejo.
- Analisar as características físico-químicas e estruturais de uma enzima escolhida.

4. Revisão Bibliográfica

4.1 Enzima

Existem duas condições fundamentais para a vida: (1) o organismo deve possuir capacidade de se replicar e (2) o organismo deve ser capaz de catalisar reações químicas com eficiência e seletividade. As reações químicas são essenciais para a manutenção da vida como conhecemos. No entanto, muitas destas reações, naturalmente, demorariam muito tempo ou nem ocorreriam em condições fisiológicas normais. A presença das enzimas nos microrganismos contorna este problema acelerando as reações biológicas. (Lehninger, 2014).

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram reações químicas através da diminuição da energia de ativação. A reação catalítica ocorre com a interação da enzima com o substrato, formando o complexo enzima-substrato que, ao final da reação, separa-se em enzima e produto. A atividade enzimática pode ser descrita pela seguinte fórmula (Lehninger, 2014, Cooper, 2000):



As enzimas possuem alta especificidade e não interagem com o produto ou são consumidas durante o processo. A primeira enzima purificada e cristalizada foi a urease em 1929, por James B. Sumner.

As maiores das enzimas conhecidas possuem estrutura proteica, porém existem exceções como as ribozimas que são formadas de RNA. As proteínas consistem em monômeros denominados aminoácidos, cuja suas estruturas possuem um hidrogênio, um grupo carboxila, um grupo amino e uma cadeia lateral R que varia para cada um. A estrutura do grupo R vai determinar diversas características dos aminoácidos como eletronegatividade, acidez e polaridade.

Existem aproximadamente 20 aminoácidos comumente encontrados em sistemas biológicos, sendo que 19 deles apresentam carbono quiral, possuindo isomeria óptica. Os resíduos de aminoácidos presentes em proteínas são estereoisômeros L (Lehninger, 2014).

As proteínas possuem quatro níveis de estrutura. As estruturas primárias consistem na sequência dos aminoácidos que a constituem e estão diretamente relacionadas a função da mesma. As estruturas secundárias descrevem o arranjo espacial dos átomos da cadeia polipeptídica principal, sem levar em consideração a conformação das cadeias laterais. Alguns exemplos de estruturas secundárias são a α hélice e folha beta pregueada, sendo que essas variações ocorrem de acordo com a angulação ϕ (ligação entre o nitrogênio do grupamento amino e o carbono quiral) e ψ (ligação entre carbono quiral e o carbono do grupamento carboxila). A estrutura terciária consiste no arranjo tridimensional de todos os átomos da proteína. Já a estrutura quaternária se baseia na presença do complexo de duas ou mais cadeias polipeptídicas (Lehninger, 2014).

As proteínas ganharam grande notoriedade após a conclusão do Projeto Genoma Humano em 1995. Ao fim deste projeto, foi observado que existia um número muito superior de proteínas que de genes codificantes para as mesmas. Com isso iniciou-se um esforço global para compreender todo o universo das proteínas, que foi denominado de Projeto Proteoma Humano. Este projeto propiciou diversos avanços em tecnologia para estudos de proteínas em pequena e larga escala (Adhikari, 2020).

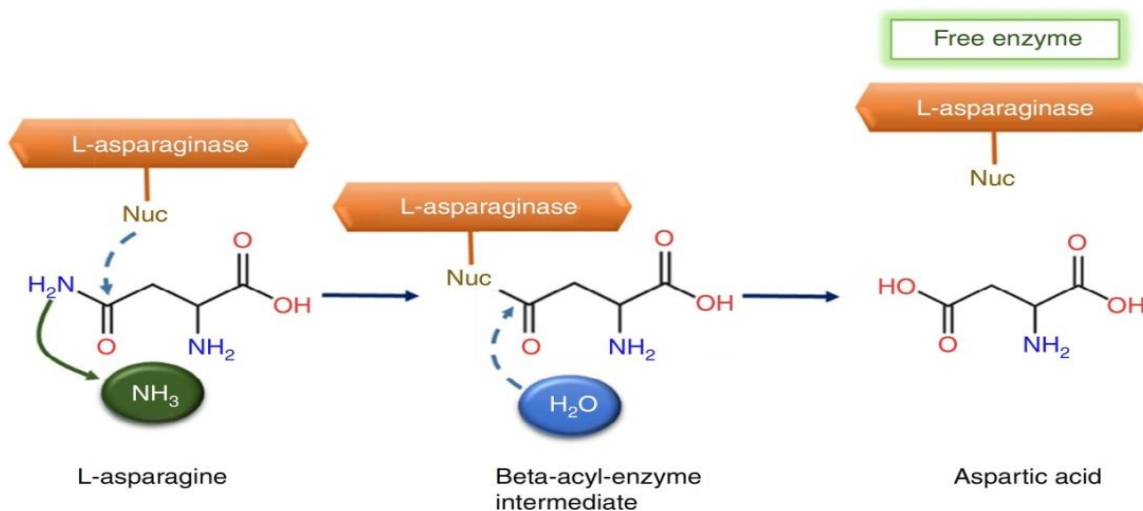
Os polimorfismos são variações que ocorrem nas sequências de aminoácidos que podem levar a uma mudança na estrutura proteica, a qual pode ocasionar diferentes conformações enzimáticas. Estas alterações podem ser positivas, aumentando a eficiência catalítica da enzima, ou podem ser negativas, causando doenças devido a malformação.

A L-asparaginase é uma enzima da classe hidrolase, mais especificamente aminohidrolase (EC 3.5.1.1), que atua clivando a ligação entre nitrogênio e carbono. A principal atividade da L-asparaginase é biotransformação da L-asparagina em ácido aspártico mais amônia. Esta reação ocorre em duas etapas como é possível observar na Figura 1. Reação (1) a enzima L-asparaginase atua sobre o carbono do grupamento amino da L-asparagina, clivando a ligação com o nitrogênio, liberando uma molécula de amônia e formando o intermediário beta-acetil, em seguida, (2) com a ativação de uma molécula de água, a enzima atua sobre o carbono do grupamento éster, incorporando uma hidroxila. Ao fim desta reação, a enzima libera o produto ácido aspártico (Chand 2020, Cachumba, 2016, Batool, 2016).

A primeira publicação referente a uma enzima hidrolase que clivava L-asparagina em ácido aspártico e amônia foi realizada em (1904) por Lang e confirmada por Furth e Friedmann em (1910). Existe uma grande quantidade de organismos produtores de L-asparaginase como fungos, bactérias, leveduras, plantas, entre outros. Devido a isso, as enzimas produzidas por microrganismos apresentam uma enorme variedade em suas características bioquímicas como pH, temperatura, peso molecular e cinética. De maneira geral, o pH ótimo de ação da enzima L-asparaginase varia de 5 a 9.5, no entanto existem algumas exceções como a enzima produzida por *Aspergillus niger* AK10 que suporta um meio mais

alcalino, abrangendo um pH de 6 a 11, porém apresentando sua atividade máxima em pH 9. O efeito da temperatura sob a atividade enzimática também varia muito de espécie para espécie, entretanto de maneira geral, a temperatura de atuação da L-asparaginase varia entre 25°C a 45°C. A espécie *Streptomyces fradiae* NEAE-82 apresenta atividade máxima à temperatura de 40°C. As principais aplicações da enzima L-asparaginase são nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Chand, 2020).

Figura 1 – Reação de bioconversão da enzima L-asparaginase.



Cachumba, 2016. *Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production*

Uma das principais aplicações da enzima L- asparaginase é para o tratamento de Leucemia Linfocítica Aguda (LLA). As células cancerígenas perdem a capacidade de produzirem um aminoácido essencial, a asparagina. Ele é produzido através da enzima asparagina sintetase que, em razão de mutações, é inibida. Com isso, as células leucêmicas necessitam utilizar a asparagina circulante na corrente sanguínea. A L-asparaginase atua diminuindo a concentração de asparagina no sangue, fazendo assim com que as células cancerígenas não consigam se multiplicar e morram. Algumas das reações adversas deste medicamento são a hipertensão e a pancreatite causadas devido ao efeito imunogênico da proteína no organismo. A L- asparaginase foi introduzida no protocolo de tratamento em 1960 e desde então a taxa de sobrevivência de pacientes aumentou em 90% (Batool, 2016, Terwilliger, 2017, Chand; 2020; Cachumba, 2016).

A L-asparaginase também foi descrita com potencial para outras aplicações médicas que abrangem doenças infecciosas (Vimal, 2018), outros tipos de cânceres como de ovário (Furusawa, 2018) e pulmão (Baskar, 2018), doenças autoimunes (Vimal, 2017) e também como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas contra leishmaniose (Singh, 2015).

Na indústria alimentícia, a enzima L-asparaginase é utilizada como um pré-tratamento no alimento para evitar a formação de acrilamida. A acrilamida é uma substância com altamente mutagênica que é muito utilizado nas indústrias têxteis e de papel e celulose. A acrilamida é formada pela interação entre L-asparagina e o açúcar redutor de alimentos ricos em carboidratos quando aquecidos acima de

120°C. A adição da enzima L-asparaginase diminui a asparagina livre no alimento, reduzindo assim em mais de 97% a formação de acrilamida (Chand 2020, Cachumba, 2016, Lone, 2018, NCBI, 2020).

4.2 Manejo do solo

O solo é um ambiente bastante variável e condições como pH, salinidade e concentração de nutrientes podem ser completamente distintas de um para outro. Estas variações se dão principalmente devido ao clima e a composição biológica, seja de macro ou microrganismo. De toda a variedade biológica presente nos solos, as bactérias representam a maior quantidade de biomassa, seguido pelos fungos (Fierer, 2017).

O microbioma possui uma grande influência nos processos que ocorrem no solo. São responsáveis pela troca de gases e nutrientes com a atmosfera, condição que pode tornar o meio mais ácido ou básico. Também tem participação em ciclos de nutrientes, além de auxiliarem as plantas com fixação de nitrogênio (Suryawanshi, 2020, Fierer, 2017).

A agricultura sofre direta influência dos microrganismos presentes no solo, estando estes ligados a produtividade. O Brasil possui aproximadamente 20% de toda a diversidade microbiana do mundo (Pylro, 2013) e, pelo fato de ser um país com a economia baseada em atividade agrícola, o conhecimento acerca da relação microbioma e solo agrícola se faz necessária (Souza, 2015).

O manejo do solo é um processo agrícola de extrema importância, pois é responsável pelo preparo do solo com o objetivo de introduzir diferentes culturas ao plantio. Diferentes tipos de manejos induzem diferentes características no solo, tais como quantidade de nutrientes e matéria orgânica, proteção a plantas invasoras e pragas. A variação destas características podem trazer benefícios ou malefícios ao solo, como com a diminuição da matéria orgânica, aumenta a possibilidade de ocorrência de erosão. Alguns tipos de manejo incluem pastagem contínua, plantio direto, integração lavoura-pecuária e plantio convencional (Komatsuzaki, 2007; Batei 2009).

O sistema de manejo de pastagem contínua consiste em manter os animais na mesma área de pastagem durante todo o período de pastejo. Normalmente utiliza-se a planta nativa sem controle da forragem. Neste método, ocorre a distribuição irregular das fezes e urinas dos animais (Laura, 1999).

O método de integração lavoura pecuária consiste na diversificação das atividades agrícolas e pecuárias utilizando o mesmo solo. Este sistema busca a utilização máxima do solo, trazendo alternativas benéficas ao meio ambiente. Alguns destes benefícios incluem a melhoria das características químicas, físicas e biológicas, diminui a chance de ocorrência de erosão e do uso de agrotóxicos. Neste manejo, a pecuária é utilizada para recuperar o solo degradado pela lavoura (Alvarenga, 2007).

Os plantios diretos e convencionais divergem em relação ao preparo do solo que antecede a introdução do cultivar. O sistema convencional utiliza de técnicas como aração e gradagens para melhorar as características do solo. Algumas vantagens incluem uma melhora da aeração, nivelamento da superfície, a

diminuição das ervas daninhas e a incorporação de adubos e fertilizantes. Entre as principais desvantagens estão um tempo e custo elevados, aumento da chance de erosão e diminuição da fertilidade devido a lixiviação. Já no sistema de plantio direto, não é realizado as etapas de preparo, sendo o solo mantido sempre coberto por um forro vegetal que tem por objetivo a proteção física. Entre as principais vantagens do sistema direto estão a melhora das características químicas e biológicas do solo como o aumento da concentração de nutrientes e uma maior atividade de microrganismos. As desvantagens incluem o uso de herbicidas, enraizamento superficial das plantas e aumento da umidade (Lamas, 2016).

4.3 Metagenômica

Metagenômica consiste na análise da diversidade biológica de uma amostra sem a necessidade de cultivo em laboratório (Gosh, 2018). O termo foi utilizado pela primeira em 1998 para verificar a variedade microbiana presente em amostras de solo (Handelsman, 1998). Com o passar dos anos, aumentou-se exponencialmente o número de artigos que utilizaram metagenômica, sendo 2015 o maior pico com mais de 1500 artigos publicados (Garrido-Cardenas, 2017).

Esta análise pode ser aplicada nas mais diversas áreas, como na compreensão de metabolismos para biorremediação (Panigrahi, 2019), na área da saúde para estudo do microbioma humano (Foster, 2019), na prospecção de novas enzimas de interesses industriais (Madhavan, 2017), entre outras. As áreas mais publicadas são as de bioquímica, genética e biologia molecular (Garrido-Cardenas, 2017).

Existem dois principais métodos de análises: (1) metagenômica baseada em fragmento de ampliação e (2) WGS Shotgun (Whole Genome Sequence) (Quince, 2017).

Algumas etapas são comuns entre os dois métodos. A maneira de se realizar a extração de DNA da amostra é de extrema importância, pois pode influenciar no resultado final. Existem diversas maneiras de extrair o material genético, tais como físicas e químicas, porém o mais recomendado é a utilização de kits enzimáticos comerciais desenvolvidos especificamente para esta atividade. Outra etapa em comum é o método de sequenciamento da amostra, sendo a plataforma Illumina a mais utilizada para análises metagenômicas (Gosh, 2018).

O método de análise WGS *Shotgun* permite verificar toda a diversidade biológica e os genes funcionais da porção analisada. O processo consiste em cinco principais etapas. Primeiramente é realizada a extração de todo o material genético da amostra. Em sequência, é feita a fragmentação do DNA, podendo ser através de métodos físicos ou químicos. O DNA é então clonado em vetores para criação das bibliotecas e o sequenciamento é realizado em seguida. Posteriormente, ferramentas computacionais são necessárias para realizar as etapas de remoção de vetores, *assembly* e anotação (Quince, 2017, Gosh, 2018).

O método baseado em fragmento, também conhecido como metataxonomia, é realizado utilizando um amplicon e apenas a região ampliada pode ser observada. Esta metodologia é bastante utilizada em análises de ecologia (Breitwieser, 2017). Para esta metodologia são utilizados primers que amplificam regiões ou genes específicos que são utilizados para identificação de

microrganismos: gene RNAr 16 S para bactérias; gene RNAr 18S e região ITS para fungos.. Com o material genético já extraído, é realizada uma ou mais PCR convencionais utilizando os primers escolhidos. Em sequência são criadas as bibliotecas e o DNA é sequenciado. Programas computacionais são utilizados para clusterização e análise dos dados (Gosh, 2018, Liu, 2020).

Existem algumas vantagens e desvantagens entre estas metodologias. O WGS *shotgun* é uma técnica que permite analisar a presença de organismos de todos os três domínios biológicos, verificar o genoma funcional e realizar o *de novo Assembly*. Suas desvantagens incluem o elevado custo do experimento, dificuldade de análise e possibilidade de contaminação do DNA. Já as vantagens da metataxonomia são a facilidade e o baixo custo do experimento que permitem verificar uma grande variedade de microrganismos pré-determinados. A principal desvantagem é a limitação dos resultados (Breitwieser, 2017, Liu, 2020, Datta, 2020).

Os microrganismos do ambiente representam uma grande área de conhecimento a ser estudada. Devido a competição microbiológica, diversas substâncias bioativas já foram descobertas a partir de microrganismos, como a exemplo da penicilina (Fleming, 1928). No entanto, apenas poucos microrganismos são capazes de serem cultivados em laboratório (Suryawanshi, 2020). Neste sentido, a metagenômica propõe a utilização de técnicas moleculares para estudar a microbiologia ambiental.

Diversos artigos relevantes relacionadas a metagenômica já foram publicadas na literatura. Yu (2011) descobriu novas esterases ativadas pelo frio em amostras do ártico. Hover et.al (2018), em amostras de solo descobriram uma nova classe de antibióticos eficiente, frente às bactérias multirresistentes. Liang (2019) descobriu a presença de vírus em amostras de água com mais de 2000 metros de profundidade.

4.4 Bioinformática

A bioinformática consiste na utilização de ferramentas computacionais para a investigação de dados biológicos. Devido a grande quantidade de dados que um experimento de metagenômica gera, softwares são necessários para as análises de acordo com o objetivo (Prayogo, 2020).

Experimentos nos quais se obtêm dados em larga escala como metagenômica, metatranscriptômica e metaproteômica necessitam ser organizados em bancos de dados. Existe uma grande variedade de bancos de dados para as mais diversas características. A partir disto, se torna possível comparar novos dados com bancos já estabelecidos, aumentando assim a riqueza e qualidade dos resultados obtidos (Breitwieser, 2019).

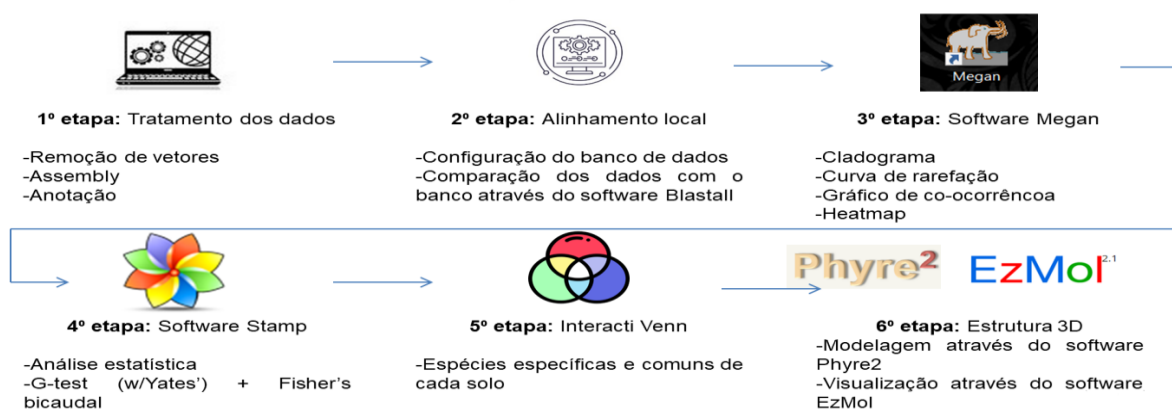
Um dos problemas encontrados nos bancos de dados é a redundância, ou seja, muitas sequências com os mesmos nomes, dificultando a diferenciação. Para contornar este obstáculo, o National Center for Biotechnology Information (NCBI) criou um banco de dados que reúne sequências de diversos outros bancos como RefSeq e Swiss-Prot e retorna resultados de proteínas idênticas a que se está procurando (NCBI, 2017).

O genoma funcional obtido ao comparar os dados com um banco de dados permite a construção de uma árvore filogenética que se baseia na relação evolucionária entre os organismos presentes. Um dos principais softwares para esta análise é o Megan. Ele utiliza o algoritmo LCA (Lowest Common Ancestor)(Huson, 2007).

O software STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) tem como objetivo realizar análises estatísticas para dados de metagenômica. A estatística tem como objetivo verificar se existe alguma diferença significativa entre as amostras analisadas, concordando assim com a hipótese nula ou hipótese 1 (Parks, 2013).

5. Materiais e Métodos

Figura 2. Fluxograma das atividades de bioinformática desenvolvidas no presente trabalho.



Em trabalho prévio o DNA das comunidades microbianas nas amostras de solo foram coletados, extraídos e sequenciados por tecnologia de nova geração Illumina pelo método de sohtgun. Os dados do sequenciamento foram tratados e anotados (Rissi, 2015).

5.1 Configuração do banco de dados e alinhamento local

Os dados referentes a enzima L- asparaginase foram baixados do banco de dados Indentical Protein Groups no site do NCBI. Os organismos inclusos foram os procaríotos, plantas e fungos, somando um total de 27.458 sequências de proteínas.

Através do terminal Linux, o banco de dados foi configurado através da seguinte linha de comando:

```
makeblastdb -in bancodedados -inputtype fasta -title dblasparaginase -dbtype prot
```

O programa blastall foi utilizado para comparação dos dados do sequenciamento com o banco de dados previamente configurado, utilizando um e-value de 10^{-5} . As linhas de comando utilizadas para o alinhamento local foram as seguintes:

```
blastall -p blastp -i Solo1.faa -o solo1result.out -b 5 -e 1e-5 -d  
sequence.fasta -m 8 -a 3
```

fazer o blast m9

```
blastall -p blastp -i Solo2.faa -o solo2result.out -b 5 -e 1e-5 -d  
sequence.fasta -m 8 -a 3
```

```
blastall -p blastp -i Solo3.faa -o solo3result.out -b 5 -e 1e-5 -d  
sequence.fasta -m 8 -a 3
```

```
blastall -p blastp -i Solo4.faa -o solo4result.out -b 5 -e 1e-5 -d  
sequence.fasta -m 8 -a 3
```

```
blastall -p blastp -i Solo5.faa -o solo5result.out -b 5 -e 1e-5 -d  
sequence.fasta -m 8 -a 3
```

5.2 Megan

O Software Megan Community Edition foi utilizado para realização das seguintes análises: curva de rarefação, árvore filogenética, heatmap e gráfico de ocorrência positiva e negativa. Os arquivos .out gerados pelo blastall foram importados para o Megan onde novos arquivos .rma foram criados. A árvore filogenética foi realizada a nível de filo e de gênero, assim como os gráficos de ocorrência positiva, negativa e o heatmap. As comparações dois a dois dos solos foram feitas para exportação dos dados no formato .txt para futuras análises no software Stamp. Todas análises foram realizadas com dados normalizados (Huson, 2007).

5.3 Stamp

Os arquivos .txt gerados no Megan foram importados no software Stamp juntamente com os metadados. A análise estatística realizada foi o G-test (w/Yates') + Fisher's bicaudal com valor de p-value de 0.05000. O formato de gráfico gerado foi o extend error bar plot (Parks, 2014).

5.4 Interacti Venn

Através do software Megan, foram gerados arquivos .txt a nível de espécie e gênero. O conteúdo dos arquivos foi colado na ferramenta de análise Interacti Venn disponível no site <www.interactivenn.net> (Heberle, 2015).

5.5 Seleção da sequência candidata

Para estudos mais aprofundados das sequências, foi realizado um processo de curagem das sequências obtidas no trabalho. Foram selecionadas as

sequências com tamanho acima de 200 aminoácidos, devido a uma análise no banco de dados Brenda Enzyme. Em seguida, as sequências selecionadas foram comparadas com os bancos de dados Pfam e CDsearch para validá-las. Posteriormente, as sequências foram rodadas no software ORFfinder para prever a ocorrência de um ou mais genes na sequência. Ao final do processo, foi escolhida uma sequência proveniente da amostra de solo de plantio direto para aprofundamento dos ensaios.

5.6 ProtParam

O software ProtParam é uma ferramenta computacional que permite prever determinadas características físicas e químicas de proteínas. Ele está disponível no site <<https://web.expasy.org/protparam/>> (Gasteiger, 2005).

5.7 Modelagem e visualização

A modelagem da proteína foi realizada pelo software Phyre 2 utilizando o modelo oculto de Markov. Ao final da análise foi gerado um arquivo de output no formato .PDB (Kelley, 2015). Este arquivo foi introduzido no software EzMol para visualização da proteína modelada anteriormente (Reynolds, 2018).

6. Resultados e discussão

6.1 Abundância

A Tabela 1 mostra a quantidade de ORFs (open read frame) presentes no arquivo e a quantidade de sequências da enzima L-asparaginase retornou o alinhamento local. A amostra de solo que retornou maior quantidade de sequências foi a de integração lavoura-pecuária com um total de 1083, enquanto a de mata nativa retornou a menor quantidade entre os solos, sendo equivalente a 383 sequências.

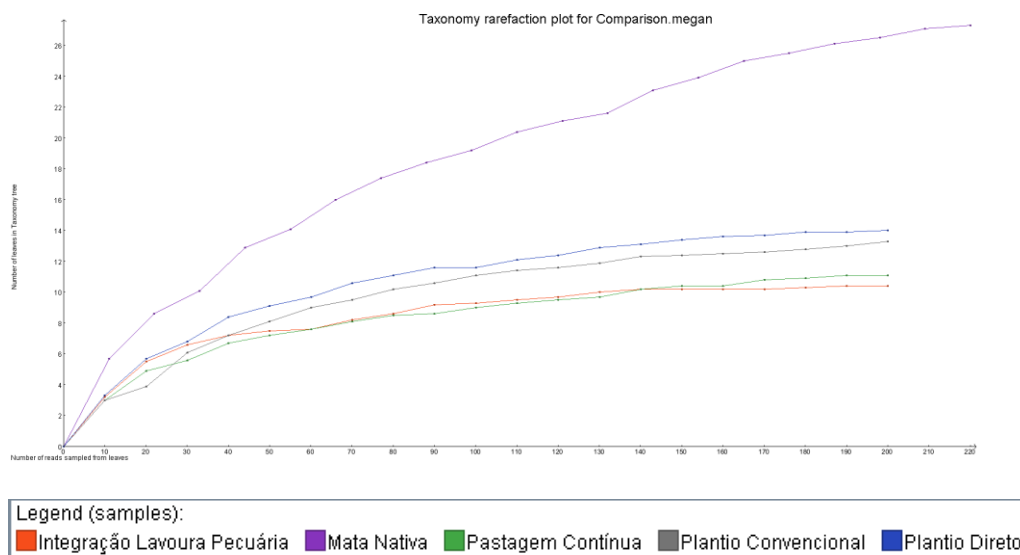
Tabela 1- Quantidade de sequências de L-asparaginase e ORFs entre as 5 amostras de solos com dados não normalizados.

Solos	L-asparaginase	ORFs
Mata Nativa	383	46430
Pastagem Contínua	1050	137703
Plantio Direto	641	75866
Integração Lavoura Pecuária	1083	128475
Plantio Convencional	582	71762

A curva de rarefação, representada na Figura 3 mostra que as amostras de solo atingiram o platô e que um aumento da quantidade de amostra não aumentaria proporcionalmente a riqueza de espécies. É possível observar que a amostra de solo de mata nativa apresentou uma riqueza de espécies maior que os

demais, seguido pelas amostras de solo de plantio direto, plantio convencional, pastagem contínua e integração lavoura-pecuária. É importante ressaltar que a curva de rarefação foi construída baseada exclusivamente nas L-asparaginase encontradas nas amostras de solo. As quatro amostras de solo manejadas apresentaram curva de rarefação próximas uma das outras. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que ambientes não alterados pelos humanos, como mata nativa, tendem a apresentar maior abundância de microrganismos devido ao equilíbrio biológico. No entanto, ambientes alterados costumam apresentar uma maior redundância, ou seja, uma quantidade elevada de microrganismos desempenhando determinada função com o objetivo de controlar o stress causado ao ambiente (Mendes, 2017). Com isso, o número de genes codificantes para a enzima L-asparaginase são maiores nos solos manejados, como é possível observar na Tabela 1, enquanto a diversidade se mantém menor, como é possível observar na Figura 3.

Figura 3. Curva de rarefação das 5 amostras de solo realizada no software Megan



6.2 Índices ecológicos

A Tabela 2. apresenta os valores dos índices de diversidade de Shannon-Weaver e Simpsons obtidos no software Megan. O índice de Shannon-Weaver mede o grau de incerteza ao prever uma espécie da amostra. Quanto menor o valor, menor a diversidade da amostra (Uramoto, 2005). A mata nativa foi o solo que apresentou maior valor do índice, enquanto o plantio convencional teve o menor valor de índice.

O índice de reciprocidade de Simpson's remete a probabilidade de duas espécies aleatórias das amostras pertencerem a mesma espécie. Quanto maior o valor, maior é considerada a diversidade (Chernov, 2015).

Os índices de Simpson's e Shannn-Weaver apresentaram valores semelhantes, o que corrobora os dados. O solo mata nativa apresentou os maiores valores de índice, seguido do solo de plantio direto. Este resultado está de acordo

com a curva de rarefação. A sequência dos demais solos foram integração lavoura-pecuária, pastagem contínua e plantio convencional. Nam (2015) verificou que os índices de diversidade apresentavam pouca diferença entre eles em amostras de metagenômica de solo. Rampelotto (2013) e Chen (2017) analisaram amostras de solo, no entanto encontraram valores para o índice de Shannon-Weaver menores em ambientes conservados comparados a ambientes manejados.

Tabela 2. Índices de diversidade das 5 amostras de solo obtidos no software Megan.

Solos	Índices	
	Shannon-Weaver	Simpsons
Mata Nativa	2.759	2.731
Pastagem Contínua	1.996	2.037
Plantio Direto	2.176	2.265
Integração Lavoura-Pecuária	1.996	2.042
Plantio Convencional	1.925	1.926

6.3 Cladograma

As Figuras 4 e 5 representam os cladogramas que permitem traçar uma breve relação entre os microrganismos produtores da enzima L- asparaginase. Os resultados retornaram a presença de 13 filios distintos, sendo 4 de eucariotos, 2 filios de archaeas e 7 de bactérias. Dos eucariotos, 3 deles pertencem ao reino *Fungi*. O outro filo é o *Oomycota*, pertencente ao supergrupo *Chromalveolata* e seu representante a nível de gênero é o *Phytophthora*.

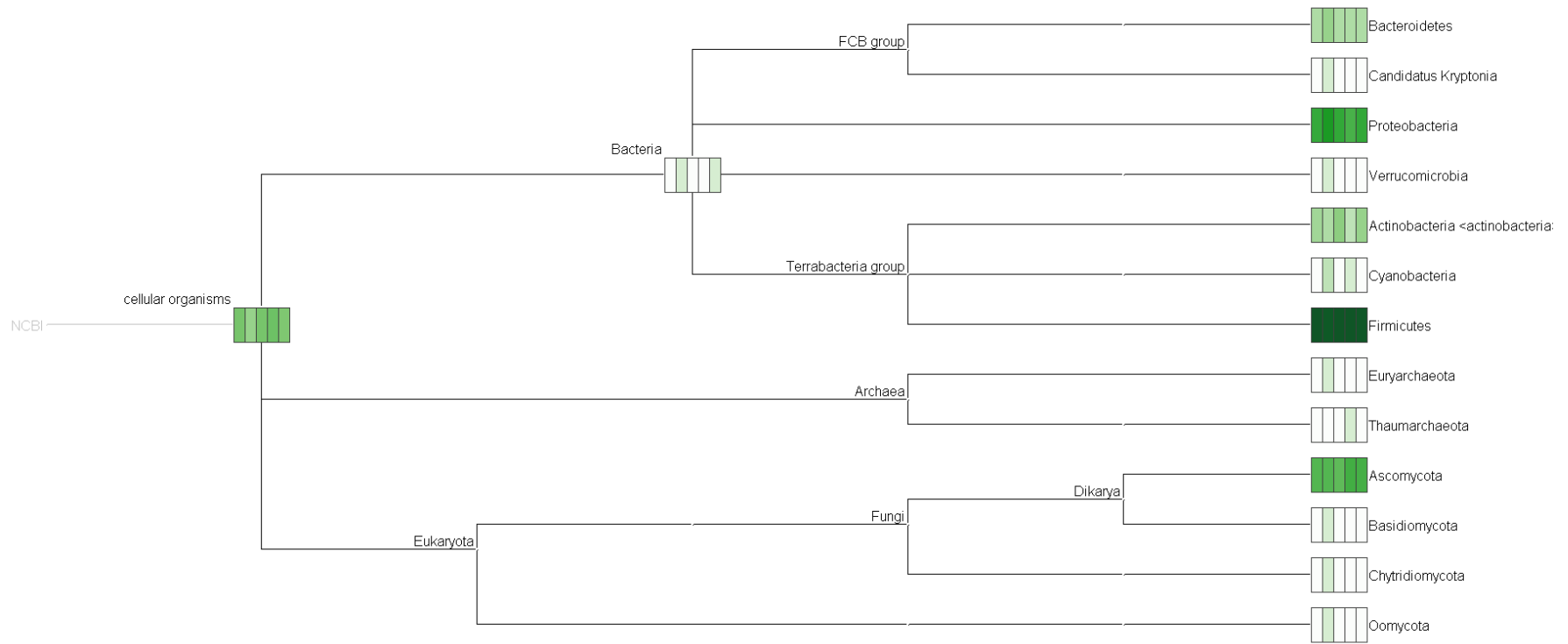
Os filios de procariotos foram os *Bacteroidetes*, *Candidatus kryptonia*, *Proteobacteria*, *Verrumicrobia*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* e *Firmicutes*. As archaeas retornaram os filios *Euryarchaeota* e *Taumarchaeota*, sendo seus representantes a nível de gênero o *Candidatus nitrosocosmicus* e *Methanobrevibacter*. Os filios pertencentes ao reino *Fungi* foram os *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Chytridiomycota*.

Em relação aos gêneros, foram encontrados 41 produtores da enzima. Os procariotos retornaram um total de 28 microrganismos distribuídos nos 7 filios. Já os fungos apresentaram 10 gêneros distribuídos nos 3 filios.

É possível observar nos cladogramas que cada nó possui 5 retângulos preenchidos pela cor verde em intensidades diferentes. Cada retângulo representa uma amostra de solo e quanto mais forte a cor verde for, maior o número de OTU's presentes. Esta escala de cor se inicia no branco, representando zero OTU's.

Figura 4. Cladograma dos filos produtores da enzima L- asparaginase nas 5 amostras de solo.

Scale:  786
0 25 50 75 100%



Phylum

Figura 5. Cladograma dos gêneros produtores da enzima L- asparaginase nas 5 amostras de solo.

Scale:  737
0 25 50 75 100%

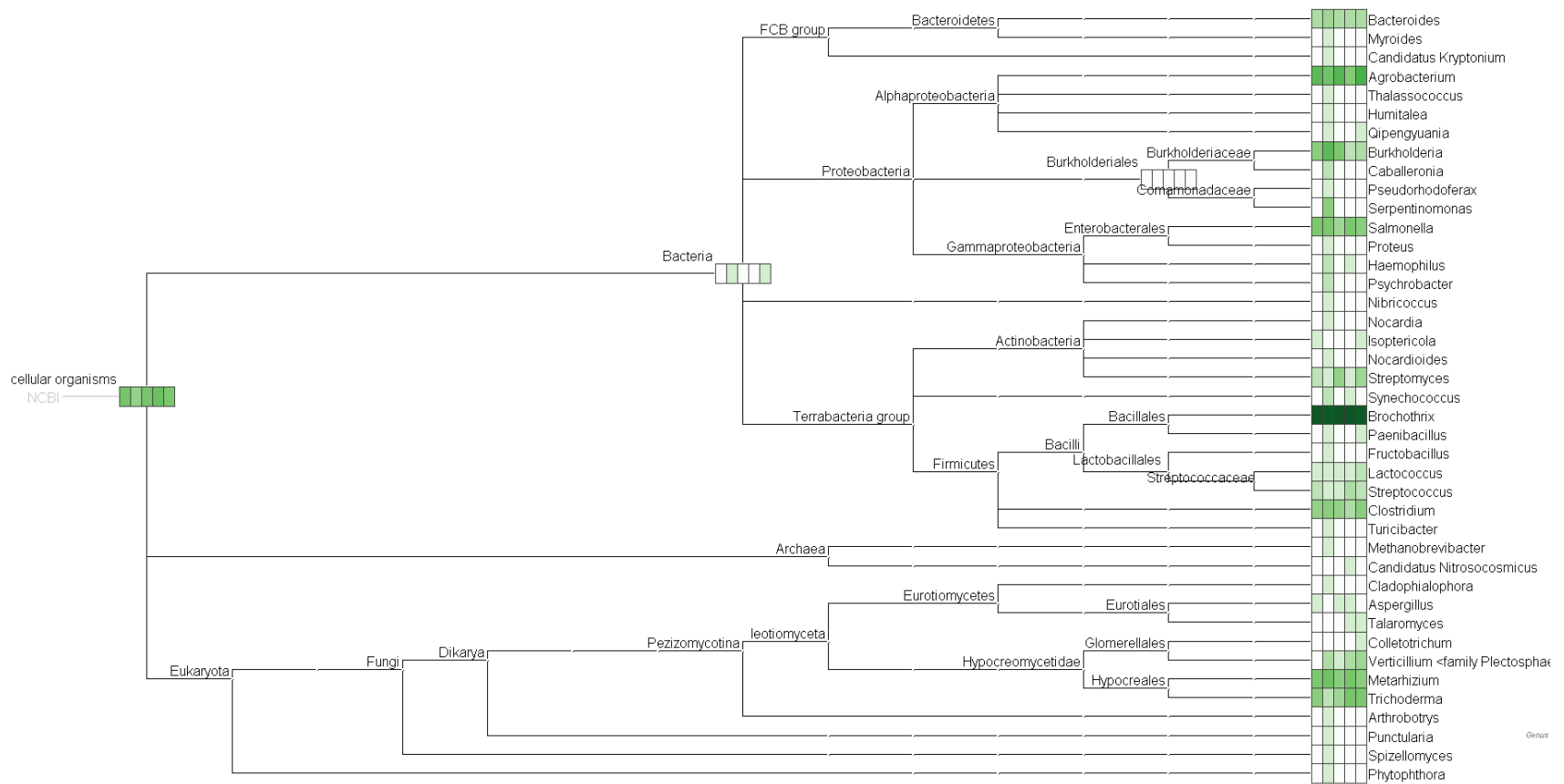
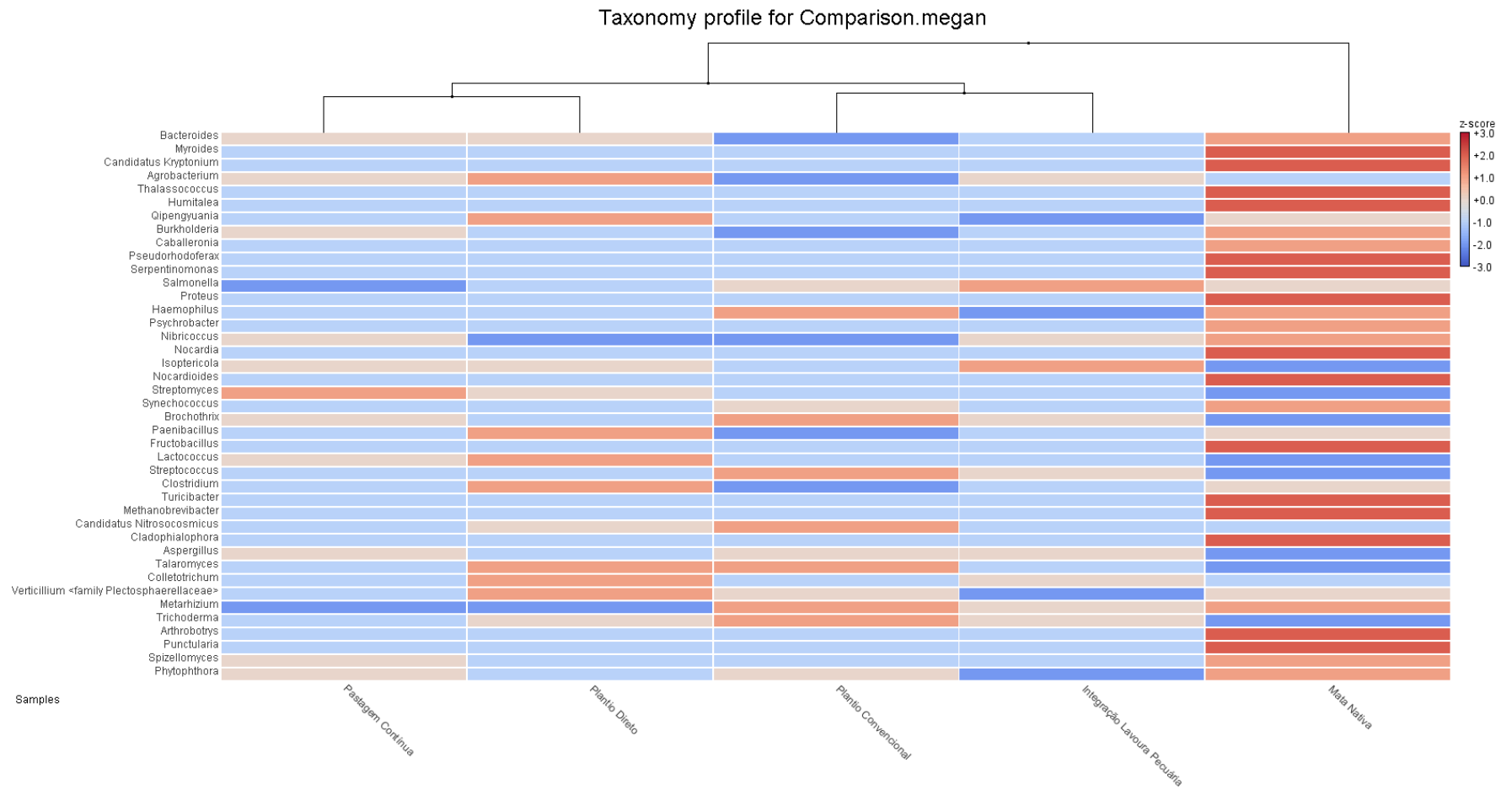


Figura 6. Heatmap a nível de filo das 5 amostras de solo realizada no software Megan.



Figura 7. Heatmap a nível de gênero das 5 amostras de solo realizada no software Megan.



6.4 Heatmap

O heatmap é um gráfico que representa comparação da quantidade de um dado em relação as amostras. As figuras 6 e 7 mostram os heatmaps de filios e gêneros respectivamente. É possível observar nos dois gráficos que o solo mata nativa apresenta maior quantidade e abundância de microrganismos potenciais produtores de L-asparaginase. No entanto, alguns microrganismos estão em maior quantidade nas outras amostras de solo, sendo representados pelos filios *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Thaumarchaeota* e *Ascomycota*, como é possível observar na Figura 5. Os filios que estiveram mais presentes na mata nativa foram o *Proteobacteria*, *Euryarchaeota*, *Basidiomycota*, *Candidatus Kryptonia*, *Bacteroidetes*, *Chytridiomycota*, *Cyanobacteria*, *Oomycota* e *Verrucomicrobia*.

O filo *Ascomycota* possui cinco gêneros representantes, sendo que o *Arthrobotrys* e *Cladophialophora* estão presentes em maior proporção na mata nativa, enquanto os gêneros *Colletotrichum*, *Talaromyces* e *Aspergillus* estão distribuídos nos demais solos.

No domínio Bacteria um filo importante é o *Proteobacteria*, apresentando seis gêneros representantes, todos em maior volume no solo de mata nativa. Estes gêneros são *Caballeronia*, *Pseudorhodofera*, *Proteus*, *Humitalea*, *Serpentinomonas* e *Thalassococcus*.

Estes dados permitem verificar que os diferentes manejos influenciaram no microbioma dos solos. Como analisado anteriormente, o solo mata nativa apresentou maior variedade de espécies e também maior volume. Carbonetto (2014) verificou que diferentes tipos de manejo de solo apresentavam perfis microbiológicos diferentes em amostras de solo do pampa argentino. Souza (2013), Babuji (2014) e Souza (2015) também verificaram alteração funcionais e microbiológicas em amostras sob diferentes tipos de manejos de solo no Brasil.

Arjum (2017) identificou, através de análise metagenômica que as bactérias dos filios *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* são produtoras da enzima L-asparaginase em amostras de solo de floresta tropical na Índia. Sobat (2021) verificou a presença da microbiota produtora da enzima L-asparaginase através de metagenômica do mar de Caspian. Os filios *Verrucomicrobiota*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Cyanobactéria* foram identificados no estudo. Estes filios também foram identificados no presente trabalho como produtores da enzima.

Wu (2018) avaliou através de metagenômica de solo se existe diferença microbiológica em amostras de monoculturas em diferentes tempos de plantio. Foi encontrado um grande volume dos gêneros *Burkholderia*, *Agrobacterium* e *Streptomyces*.

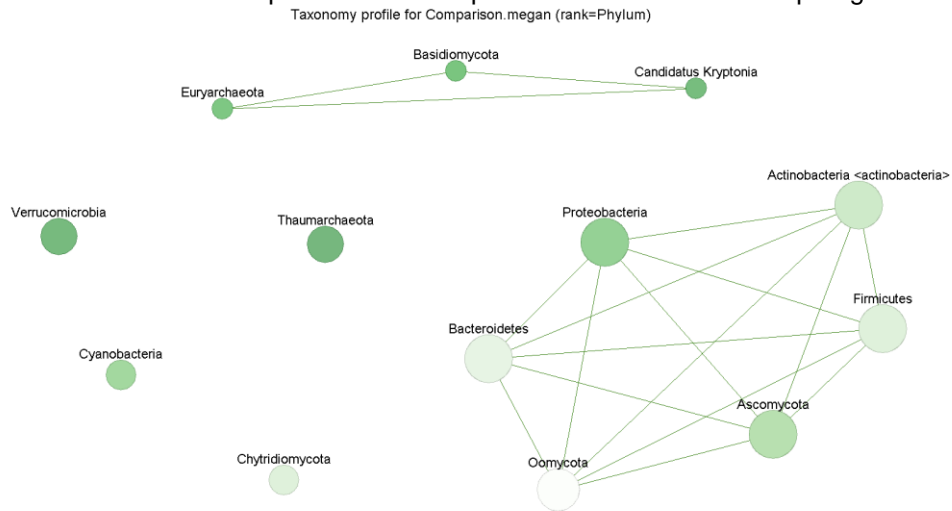
Meneghini (2017) verificou a microbiota do solo de agricultura adubado com dejetos orgânicos de um zoológico. Foi identificado a presença dos filios *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Cyanobacteria*. Também foram os gêneros *Paenibacillus*, *Nocardioide*s e *Streptomyces*.

6.5 Co-ocorrência

Os gráficos de co-ocorrência permitem verificar se os organismos se relacionaram entre os solos. As Figuras 8 e 9 representam os gráficos de co-ocorrência positiva e positiva/negativa dos filios e as figuras 9 e 10 representam os gráficos de co-ocorrência positiva e positiva/negativa dos gêneros dos microrganismos produtores de L- asparaginase nas 5 amostras de solo.

De acordo com a Figura 8, é possível observar que os filios *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Thaumarchaeota* e *Chytridiomycota* ocorrem sem interagir com nenhum outro filio. Os demais se dividem em 2 grupos. O primeiro consiste na interação entre o *Euryarchaeota*, *Basidiomycota* e *Candidatus Kryptonia*. O outro grupo integra os filios *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Asscomycota*, *Oomycota*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*.

Figura 8. Gráfico de co-ocorrência positiva dos filios produtores da enzima L- asparaginase.



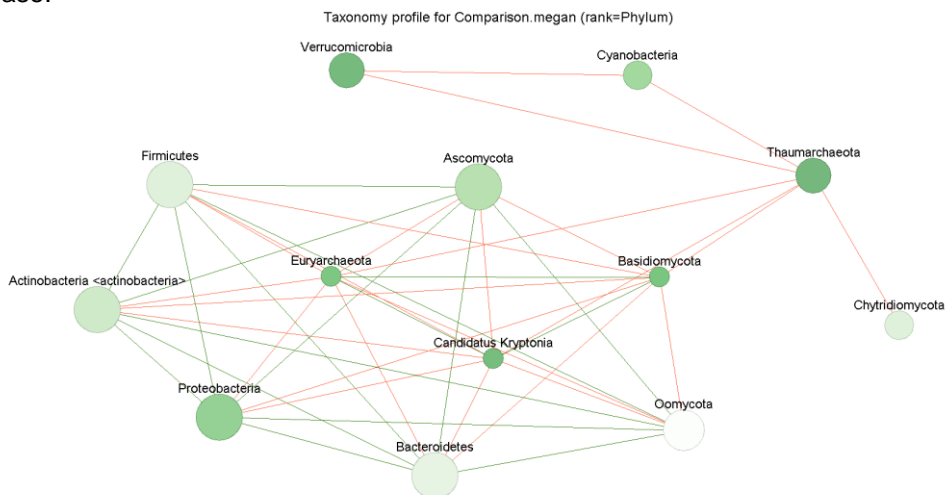
O gráfico de co-ocorrência positiva e negativa está representado na Figura 9. Assim como na Figura 8, é possível observar que os filios *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Thaumarchaeota* e *Chytridiomycota* não se relacionam com nenhum outro, os filios *Euryarchaeota*, *Basidiomycota* e *Candidatus Kryptonia* só interagem entre si e os demais formam um grande grupo de interação.

Szoboszlay (2020) analisou dados metagenômicos de amostras de solo e verificou que o filo *Firmicutes* com *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria* se relacionavam.

Li (2018) analisou o microbioma de solos com diferentes tipos de interplantação e verificou que os filios *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* apresentavam interação em análise de co-ocorrência.

Barberán (2012) estudou o metagenoma de 151 amostras de solo e identificou que os filios *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia* interagem entre si.

Figura 9. Gráfico de co-ocorrência positiva e negativa dos filos produtores da enzima L-asparaginase.

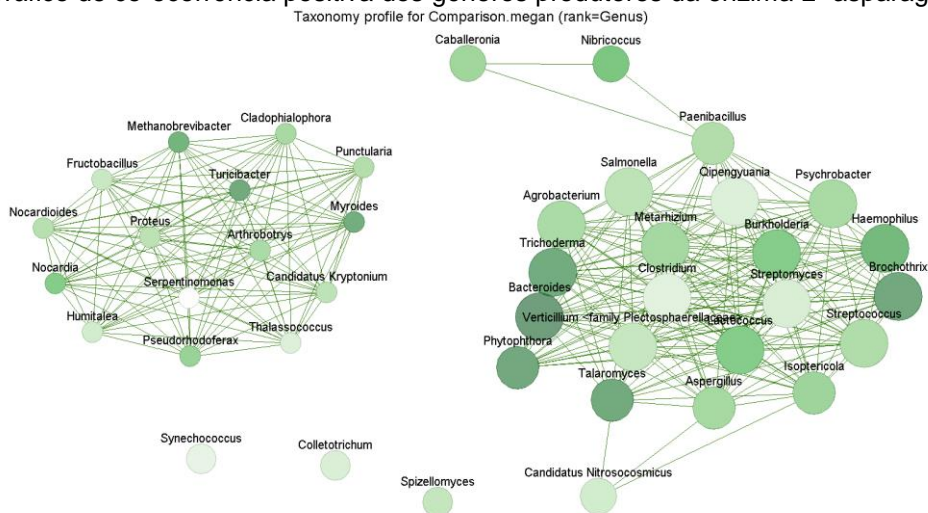


Através da Figura 10. é possível observar que os gêneros *Synechococcus*, *Colletotrichum* e *Spizellomyces* ocorrem separadamente. Os demais microrganismos se dividiram em dois grandes grupos.

O primeiro grupo consiste em 16 gêneros: *Cladophialophora*, *Punctularia*, *Myroides*, *Candidatus Kryptonium*, *Thalassococcus*, *Pseudorhodofera*, *Humitalea*, *Nocardia*, *Nocardioideis*, *Fructobacillus*, *Methanobrevibacter*, *Turcibacter*, *Proteus*, *Arthrotrix* e *Serpentinomonas*.

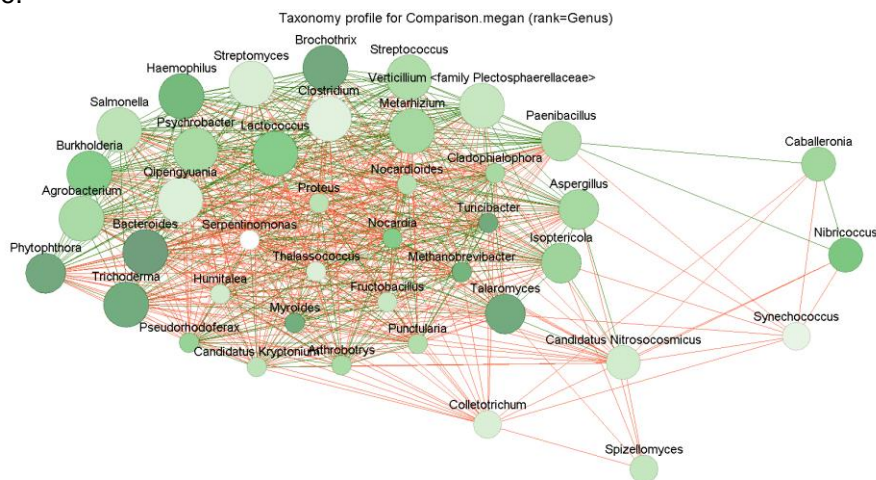
O segundo grupo possui 20 gêneros, no entanto possui 2 peculiaridades. Os gêneros são: *Paenibacillus*, *Haemophilus*, *Psychrobacter*, *Brochothrix*, *Streptococcus*, *Isopterocola*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Bacteroides*, *Trichoderma*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *lactococcus*, *Clostridium*, *Metarhizium* e *Qipengyuania*. Além destes gêneros, o *Caballeronia* se relaciona apenas com 2 microrganismos deste grupo que são o *Nibricoccus* e *Paenibacillus*. Isto acontece também com o *Candidatus Nitrosocosmicus* que interage apenas com *Talaromyce*, *Aspergillus* e *Isopterocola*.

Figura 10. Gráfico de co-ocorrência positiva dos gêneros produtores da enzima L- asparaginase.



O gráfico de co-ocorrência positiva e negativa dos gêneros está representado na Figura 11. Ele está de acordo com alguns pontos do gráfico de co-ocorrência positiva. Os gêneros *Synechococcus*, *Colletotrichum* e *Spizellomyces* não se relacionam com nenhum outro. O gênero *Candidatus Nitrosocosmicus* interage apenas com *Talaromyce*, *Aspergillus* e *Isoptericola*. Os gêneros *Nibricoccus* e *Paenibacillus* se relacionam apenas entre si e com o gênero *Caballeronia*, este que se relaciona com diversos outros.

Figura 11. Gráfico de co-ocorrência positiva e negativa dos gêneros produtores da enzima L-asparaginase.



6.6 Diagrama de Venn

O programa interactiveen permite observar através do diagrama de Venn quais espécies foram exclusivas de cada amostra de solo e quais foram comuns entre as amostras. A Figura 12. apresenta o diagrama de Venn a nível de espécie para as 5 amostras de solo.

Figura 12. Gráfico de interação das espécies produtores da enzima L- asparaginase nas 5 amostras de solo.

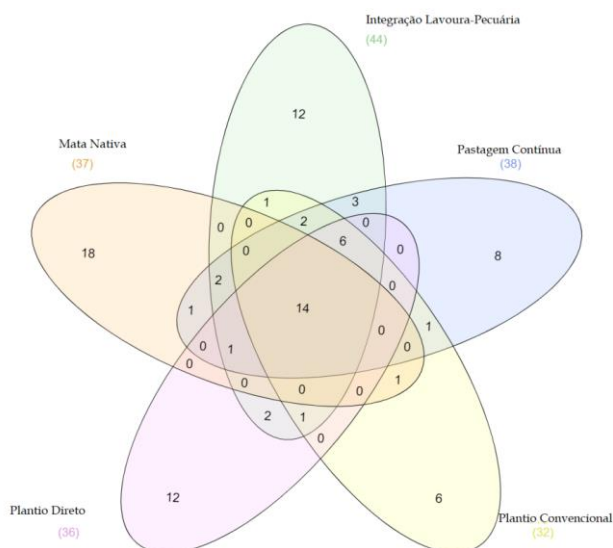


Tabela 3. Lista de espécies presentes exclusivamente em cada amostra de solo e as que são comum a todas amostras de solo.

Amostras		Espécies
Mata Nativa		<i>Myroides odoratus</i> <i>Candidatus Kryptonium thompsoni</i> <i>Thalassococcus</i> sp. S3 <i>Humitalea rósea</i> <i>Pseudorhodoferax</i> sp. Leaf274 <i>Serpentinomonas mccroryi</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Nocardia farcinica</i> <i>Nocardioides lianchengensis</i> <i>Synechococcus</i> sp. WH 8102 <i>Fructobacillus ficulneus</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Turcibacter sanguinis</i> <i>Methanobrevibacter curvatus</i> <i>Cladophialophora yegresii</i> <i>Metarhizium acridum</i> <i>Arthrobotrys entomopaga</i> <i>Punctularia strigosozonata</i>
Integração Pecuária	Lavoura-	<i>Rhodoplanes</i> sp. Z2-YC6860 <i>Methylobacterium radiotolerans</i> <i>Rhodopila globiformis</i> <i>Massilia eurypsychrophila</i> <i>Proteus hauseri</i> <i>Fimbrioglobus ruber</i> <i>Phycococcus dokdonensis</i> <i>Actinopolymorpha cephalotaxi</i> <i>Synechococcus</i> sp. RS9917 <i>Deinococcus proteolyticus</i> <i>Komagataella phaffii</i> <i>Rhizoctonia solani</i>
Pastagem Contínua		<i>Parafilimonas terrae</i> <i>Imtechella halotolerans</i> <i>Rhizomicrobium</i> sp. SG733 <i>Pacificimonas flava</i> <i>Achromobacter</i> sp. ATCC31444 <i>Actinopolymorpha singaporensis</i> <i>Paenibacillus lupini</i> <i>Phascolarctobacterium faecium</i>
Plantio Direto		<i>Granulicella</i> sp. GAS466 <i>Rhizobium oryzae</i> <i>Desulfovibrio</i> sp. A2 <i>Pasteurella bettyae</i> <i>Pseudomonas</i> sp. NFR02 <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Friedmanniella luteola</i> <i>Microlunatus phosphovorus</i> <i>Streptomyces griseocarneus</i> <i>Streptomyces</i> sp. NWU339 <i>Thermococcus barophilus</i> <i>Moniliophthora roreri</i>
Plantio Convencional		<i>Aeromonas rivuli</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Actinomadura parvosata</i> <i>Bacillus freudenreichii</i>

	<i>Paenibacillus catalpae</i>
	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Comum a todas amostras	<i>Bacteroides pyogenes</i>
	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>
	<i>Agrobacterium vitis</i>
	<i>Qipengyuania cítrea</i>
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
	<i>Salmonella entérica</i>
	<i>Psychrobacter sp. JCM 18903</i>
	<i>Streptomyces laurentii</i>
	<i>Brochothrix campestris</i>
	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Streptococcus pneumonia</i>
	<i>Verticillium dahlia</i>
	<i>Metarhizium anisopliae</i>
	<i>Trichoderma quizhouense</i> .

Os seguintes microrganismos ocorreram exclusivamente na amostra de solo de mata nativa. *Myroides odoratus* é uma bactéria Gram-negativa de relevância médica devido sua patogenicidade para pacientes imunossuprimidos. Sua presença já foi relatada em amostras de solo e água (Gunzer, 2018; Vancanneyt, 1996). O microrganismo termófilo *Candidatus Kryptonium thompsoni* foi identificado através de análise de metagenômica de águas termais (Emiley, 2016). O *Thalassococcus* sp. S3 é uma bactéria capaz de degradar o composto mutagênico carbazol e foi identificado através de sequenciamento em 2019 em amostras de água no Japão (Vejarano,2019). A bactéria da espécie *Humitalea rosea* é uma Gram-negativa isolada de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo na Itália (Margesin,2013; Zhang, 2014). *Pseudorhodofera* sp. Leaf274 é um microrganismo identificado como pertencente a microbiota das folhas de *Arabidopsis thaliana* (Bai, 2015), no entanto, outra espécie deste gênero já foi identificada em amostra de solo (Bruland, 2009). O processo de alteração de rochas para a formação de serpentinas é conhecido como serpentização. Este processo gera um ambiente aquoso com elevado pH e baixa salinidade, onde a bactéria *Serpentinomonas mccroryi* foi descrita pela primeira vez por Suzuki (2014) e reforçado por Ohlsson (2019). *Proteus mirabilis* é uma bactéria Gram-negativa e patogênica considerada uma das principais causas de infecção urinária (Schaffer, 2017). Ela já foi reportada anteriormente em amostras de solo (Mohite, 2010; Jasuja, 2013) e como produtora da enzima L-asparaginase (Peterson, 1969; Imada, 1972). A *Nocardia farcinica* é uma bactéria Gram-positiva patogênica oportunista responsável por diversas enfermidades como infecção pulmonar e seus isolados clínicos já foram sequenciados (Valdezate, 2017). Lee (2010) e Rodrigues (2015) reportaram sua presença em amostras de solo. A espécie *Nocardioides lianchengensis* foi proposta por Zhang (2012) ao analisar amostras de solo da China. O *Synechococcus* sp. WH 8102 é uma cianobactéria marinha responsável por cerca de 20% da fixação de carbono dos oceanos. Já possui seu genoma e proteoma caracterizados (Scanlan, 2003; Palenik, 2003; Cox, 2013) e o gênero já foi identificado em amostras de solo da Korea (Kim, 2008). *Fructobacillus ficulneus* é uma espécie de bactéria acidolática reclassificada por Endo (2008) e que foi isolada de amostras de figo (Antunes, 2002). O *Clostridium botulinum* é uma bactéria de relevância médica por causar paralisia flácida devido suas neurotoxinas, estando muito associada a infecções alimentares é amplamente reportada em amostras de solo (Smith, 2020; Souillard, 2014; Zhorzholiani, 2017).

Turicibacter sanguinis é um microrganismo que faz parte da microbiota normal de diversos animais e insetos, incluindo humanos. Já foi identificado em amostras de sangue e fezes (Cordero, 2012; Cuiv, 2021; Bosshard, 2002). *Methanobrevibacter curvatus* é uma archea metanogênica presente na microbiota de humanos, animais e insetos e é considerado um grande produtor de gás do efeito estufa (Velu, 2010; Poehlein, 2021; Leadbetter, 1996). O fungo *Cladophialophora yegresii* é comum de regiões semi-áridas e é considerado um patógeno de plantas, mais especificamente para cacto, organismo no qual o fungo foi descoberto (Hoog, 2007; Badali, 2008). O *Metarhizium acridum* é um fungo entomopatógeno utilizado como controle biológico de insetos e encontrado em amostras de solo (Gaol 2011; Fernandes, 2010). Dwivedi (2014), através de análises *in silico* reportou a espécie como produtora de L-asparaginase. *Arthrobotrys entomopaga* é um fungo carnívoro capaz de preda animais da ordem Callembola e tem potencial para utilização no controle biológico. Foi isolado em amostra de solo por Wu (2013). *Punctularia strigosozonata* é um fungo comum de regiões quentes e é encontrado em amostras de madeira e solo (Bondartseva, 2000; Lim, 2010).

A amostra de solo de integração lavoura-pecuária apresentou exclusivamente as seguintes espécies. *Rhodoplanes* sp. Z2-YC6860 é uma espécie de bactéria encontrada em amostras de solo da rizosferas de plantas e se mostrou capaz de degradar azitromicina (Barajas, 2020; Aguiar, 2020). O *Methylobacterium radiotolerans* é uma bactéria Gram-negativa fixadora de nitrogênio e reportada em casos de infecção nosocomial. Já foi isolada em amostras de solo da Arábia Saudita e reportada por Dwivedi (2014) como produtor da enzima L-asparaginase. (Eevers, 2015; Midha, 2016; Cordovana, 2019; Nzila, 2016). Isolada de águas termais com alta concentração de ácido sulfúrico, *Rhodopila globiformis* é uma bactéria acidófila, anaeróbica e fototrófica (Pfffenig, 1974; Imhoff, 2018). *Massilia eurypsychrophila* é uma bactéria psicrófila isolada de amostras de gelo e solo de ambientes frios (Shen, 2015; Cong, 2020). A espécie *Proteus hauseri* já foi reportado em amostras ambientais e animais. Possui capacidade de gerar bioeletricidade e degradar corantes azos, além de ter tolerância a elevadas concentrações de cobre (Ng, 2013; Ohara, 2000; Drzewiecka, 2016). *Fimbrioglobus ruber* foi descoberto em uma turfeira, ecossistema com alta concentração de matéria vegetal e apresenta potencial para degradar quitina (Ravin, 2021; Kulichevskaya, 2017). A bactéria Gram-positiva *Phycoccus dokdonensis* foi identificada por Yoon(2008) em amostras de solo na ilha de Dokdo, Korea. A espécie *Actinopolymorpha cephalotaxi* é uma bactéria Gram-positiva isolada da rizosfera de *Cephalotaxus fortunei* por Yuan (2010). *Synechococcus* sp. RS9917 é uma cianobactéria que já foi identificada através de metagenômica em amostras de água salina e alcalina e seu gênero já foi relatado como produtor da enzima L-asparaginase (Guarrido, 2020; Kebeish, 2016). *Deinococcus proteolyticus* é um microrganismo com alta tolerância a radiação e foi analisado amostras de fezes de lhamas (Copeland, 2012). *Komagataella phaffii* é uma espécie de fungo metilotrófico muito utilizados em processos de expressão heteróloga de proteínas, sendo verificado pela primeira vez em amostras de árvores em 1950 e posteriormente em amostras de solo contaminado na China (Bernauer, 2021; Liaquat, 2020). O fungo da espécie *Rhizoctonia solani* é um fitopatógeno de importância para a produção de batatas e já foi identificado em análise de metagenômica de amostras de solo (Elsas, 2008).

As seguintes espécies foram exclusivas da amostra de solo de pastagem contínua. *Parafilimonas terrae* é uma bactéria Gram-negativa isolada de amostra de solo de estufa na Korea (Kim, 2014). A espécie *Imtechella halotolerans* é uma bactéria Gram-negativa isolada de amostra de água de estuário na Índia (Surendra, 2012). *Rhizomicrobium* sp. SG733 foi sequenciado de amostra de raiz de *Sorghum bicolor*, entretanto este gênero já foi identificado em amostra de solo (Palletier, 2020; Xue, 2017). Liu (2014) isolou a espécie *Pacificimonas flava* pela primeira vez em amostra de água do mar. *Achromobacter* sp. ATCC31444 é uma cepa pertencente ao gênero *Achromobacter* o qual já foi relatado em amostras de solo apresentando capacidade de degradar atrazina (Fernandes, 2018). *Actinopolymorpha singaporensis* é uma bactéria pleomórfica isolada de amostras de solo de floresta úmida em Singapura (Wang, 2001). A espécie *Paenibacillus lupini* é uma bactéria Gram-positiva isolada de amostra de nódulo da raiz de *Lupinus albus* na Espanha (Carro, 2014). Dot (1993) descreveu a bactéria *Phascolarctobacterium faecium* isolada através de amostras de fezes de coala Bao (2020) já identificou esta bactéria em análise de microbioma de fezes humanas.

Os microrganismos exclusivos da amostra de solo de plantio convencional estão apresentados a seguir. *Aeromonas rivuli* é uma bactéria Gram-negativa isolada por Figueras (2011) em amostras de água de riacho. A espécie bacteriana *Acinetobacter baumannii* é causadora de infecções nosocomiais e já foi isolada e identificada em amostras de solo através de análises dependentes e independentes de cultivo, além de já ter sido relatado como um microrganismo produtor da enzima L-asparaginase (Erdönmez, 2017; Garcera, 2017; Muneer, 2020). A bactéria *Actinomadura parvosata* é encontrada em solos e identificado como produtora do antibiótico parvodicina (Christensen, 1987). A espécie *Bacillus freudenreichii* foi descrita em 1889 e isolada em amostra de solo em 1982, possui capacidade de decompor urease (Gibson, 1934; Sawada, 1982). *Paenibacillus catalpae* é uma bactéria Gram-positiva isolada de amostra de solo da rizosfera de *Catalpa speciosa* (Zhang, 2013). *Pyrococcus furiosus* é uma arqueia hipertermófila isolada por Fiala (1986) em amostras de sedimento de águas quentes. Já foi identificado em análise metagenômica de sedimentos e reportado como produtor da enzima L-asparaginase (Zhu, 2013; Bansal, 2010).

A amostra de solo de plantio direto apresentou os seguintes microrganismos exclusivos. *Granulicella* sp. GAS466 é uma bactéria pertencente ao filo das Acidobactérias e seu gênero já foi identificado em amostras de solo do bioma tundra (Oshkin, 2019). *Rhizobium oryzae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio isolada de amostras de arroz por Peng (2008). A bactéria *Desulfovibrio* sp. A2 é resistente a altas concentrações de cobre e redutora de sulfato, sendo isolada em um processo de fundição de zinco na Rússia e seu gênero identificado em amostras de solo de plantação de arroz (Dianou, 1998; Mancini, 2011). *Pasteurella bettyae* é uma bactéria patogênica de humanos e outros animais. Já foi isolada em antílopes e identificada em amostras de metagenômica de humanos com doenças pulmonares (Liu, 2019; Fereidouni, 2015). A bactéria *Pseudomonas* sp. NFR02, pertence ao gênero *Pseudomonas*, o qual já foi identificado em amostras de árvores de florestas e reportado como produtor da enzima L-asparaginase (Fatima, 2019; Kong, 2020). A bactéria *Xanthomonas campestris* é um fitopatógeno causador da doença da raiz preta em algumas espécies de plantas, porém é utilizado no processo fermentativo para produção de goma de xantana. Já foi

identificado em análise de metagenômica de água (Wang, 2012; Wu, 2009). A espécie *Friedmanniella luteola* é uma bactéria Gram-negativa isolada por Iwai (2010) em aranhas. Já foi identificada em análise metagenômica de amostra de patina, composto químico formado na superfície de materiais metálicos (Antonelli, 2020). *Microlunatus phosphovorus* é uma bactéria Gram-positiva e acumuladora de polifosfato isolada por Nakamura (1995) em amostras de lodo ativado. *Streptomyces griseocarneus* é uma bactéria isolada de amostras de solo do Japão produtora de Hydroxystreptomicina e possui potencial aplicação como biofertilizante (Liotti, 2019; Benedict, 1951). A espécie *Streptomyces* sp. NWU339 foi isolada de amostras de solo da rizosfera de milho na África do Sul e sequenciada através da tecnologia Illumina (Adegboye, 2018). A arqueia *Thermococcus barophilus* apresenta características termófilas e redutora de enxofre, sendo isolada na profundidade de fontes hidrotermais. Já foi identificada em análise metagenômica de amostras de minas de carvão (Jha, 2020; Marteinson, 1999). *Moniliophthora roreri* é um fungo fitopatogênico que representa um grande problema para produção de cacau. Ele já foi identificado em análise metagenômica de amostra de cacau fermentado na Costa Rica (Verce, 2021; Barbosa, 2018).

Os seguintes microrganismos ocorreram simultaneamente em todas as amostras de solo. A espécie *Bacteroides pyogenes* um patógeno causador de zoonose, encontrado em amostras de animais, inclusive na microbiota de vacas (Benno, 1983; Madsen, 2011; Santos, 2011). *Agrobacterium larrymoorei* é uma bactéria Gram-negativa identificada por Bouzart (2001) em amostras aéreas de *Ficus benjamina*. A espécie *Agrobacterium vitis* é uma bactéria Gram-negativa que foi isolada de amostras de videiras (Ophel, 1990). Ambas as espécies foram posteriormente identificadas através de metagenômica de *Selaginella kraussiana*, uma planta invasora na Nova Zelândia (Dang, 2019). A espécie *Qipengyuania cítrea* é uma bactéria Gram-negativa isolada no mar do mediterrâneo (Xu, 2020). A *Burkholderia pseudomallei* é uma bactéria Gram-negativa altamente patogênica e causadora de melioidose que já foi identificada em análise metagenômica de amostras de solo (Potisap, 2018; Brett, 1997). A espécie *Salmonella enterica* é patogênica e pode causar doenças relacionadas a infecção alimentar como salmonelose. Ela já foi identificada em diversas análises de metagenômica de solo e como produtor da enzima L-asparaginase (Mandal, 2019; Arthruson, 2011; Jarvis, 2015; Pearce, 2012; Jennings, 1993). A bactéria Gram-negativa e psicrófila *Psychrobacter* sp. JCM 18903 foi isolada de organismos de águas frias (Kudo, 2014). *Streptomyces laurentii* é um fungo identificado por Trejo (1977) em amostras de solo de Nova Jersey. A bactéria *Brochothrix campestris* possui característica de esporulação e foi identificada em amostra de solo (Gale, 2013). A bactéria *Lactococcus lactis* é Gram-positiva, fermentativa e utilizada na indústria de alimentos para produção de queijos e iogurtes e já foi identificada através de metagenômica em amostra de solo de silagem de grama (Song, 2017; Eikmeyer, 2013). *Streptococcus pneumoniae* é um patógeno humano causador da meningite bacteriana e já foi identificado através de análise de solo e de metagenômica de pacientes e de amostra de água (Hinojosa, 2017; Zhang, 2019; Evstigneeva, 2009). *Verticillium dahliae* é um fungo fitopatogênico que pode causar doença em mais de 200 plantas distintas, sendo produtor da enzima L-asparaginase e identificado através de análise de metagenômica de plantação de morangos com baixo rendimento (Xu, 2015; Li, 2020; Dwivedi, 2014). O fungo *Metarhizium anisopliae* é

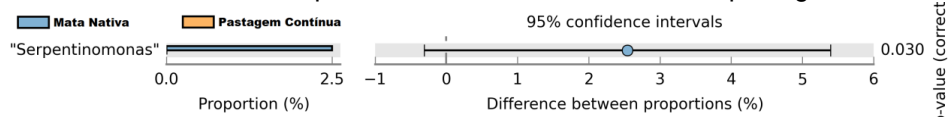
um patógeno de artrópodes e tem potencial aplicação no controle biológico de pragas e já foi identificado de solo de agricultura (Juliya, 2019). Observado por Li (2012) em amostras de solo o fungo *Trichoderma guizhouense* se mostrou com potencial para aplicação como biofertilizante (Liu, 2020).

6.7 Análise estatística

As análises estatísticas entre as amostras de solo estão apresentadas nas Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19. Devido ao rigor dos parâmetros usados na análise, a comparação entre os solos de pastagem contínua (2) e integração lavoura pecuária (4), plantio direto (3) e integração lavoura pecuária (4) e integração lavoura pecuária (4) e plantio convencional (5) não retornaram resultado.

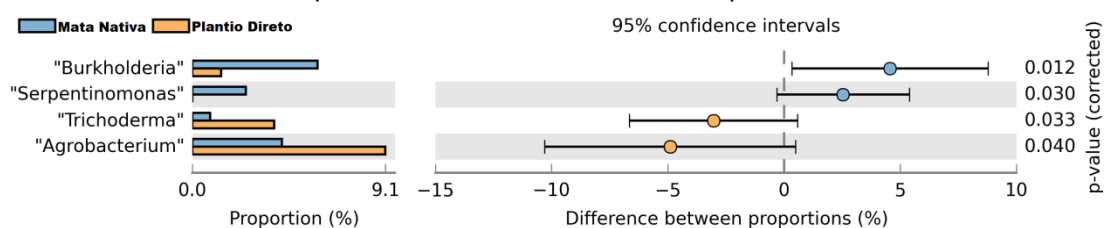
A comparação da amostra de solo de mata nativa com a de manejo de pastagem contínua apresentou diferença estatística significativa em relação a presença do gênero *Serpentinomonas* que esteve em maior proporção na mata nativa.

Figura 13. Análise estatística comparando os solos de mata nativa e pastagem contínua.



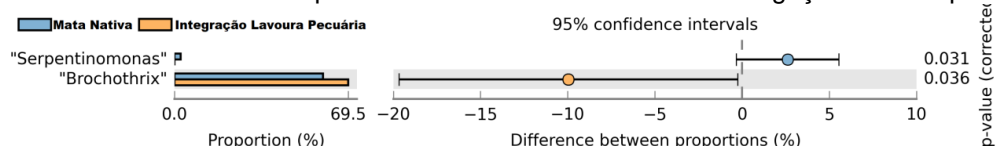
Já comparando a amostra de solo de mata nativa com a de plantio direto, além da *Serpentinomonas*, o gênero *Burkholderia* também apresentou uma maior proporção no solo mata nativa, no entanto, o manejo de plantio direto apresentou dois gêneros com diferença estatística significativa que foram o *Trichoderma* e o *Agrobacterium*.

Figura 14. Análise estatística comparando os solos de mata nativa e plantio direto.



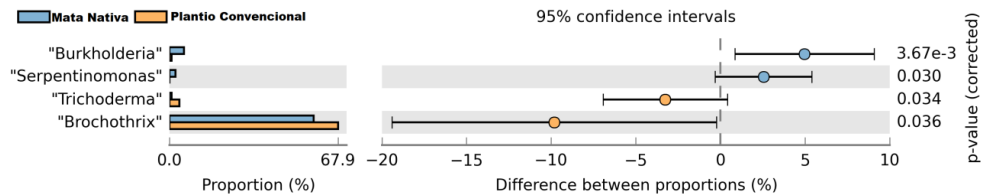
A relação entre as amostras de solo de mata nativa e integração lavoura-pecuária se deu pela diferença significativa dos gêneros *Serpentinomonas*, em maior proporção na mata nativa, e *Brochothrix* em maior proporção no solo de integração lavoura-pecuária, apesar de elevada presença em ambos.

Figura 15. Análise estatística comparando os solos de mata nativa e integração lavoura-pecuária.



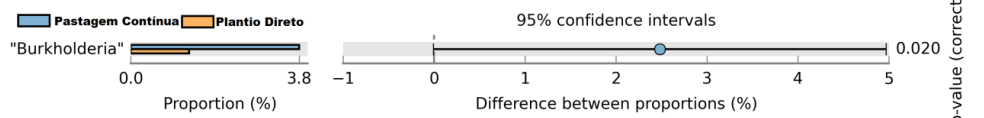
A comparação estatística entre as amostras de solo de mata nativa e plantio convencional apresentou quatro gêneros com diferença significativa entre os solos. O *Burkholderia* e *Serpentinomonas* em maior proporção na mata nativa e o *Trichoderma* e *Bochotrix* em maior proporção no plantio convencional.

Figura 16. Análise estatística comparando os solos de mata nativa e plantio convencional.



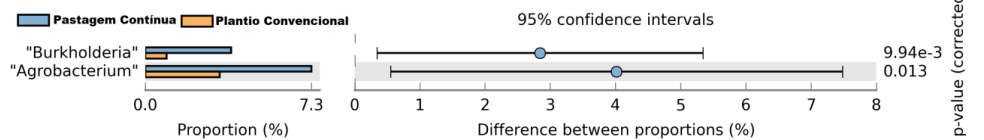
Apenas um gênero apresentou diferença estatística significativa na comparação entre as amostras de solo de pastagem contínua e plantio direto, que foi o *Burkholderia*, estando em maior proporção no solo de pastagem contínua.

Figura 17. Análise estatística comparando os solos de pastagem contínua e plantio direto.



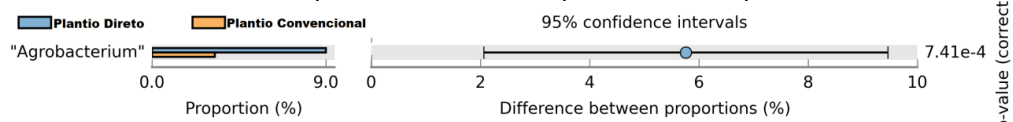
Comparando as amostras de solo de pastagem contínua e plantio convencional, os gêneros que apresentaram diferença estatística significativa foram o *Burkholderia* e *Agrobacterium*. Ambos estavam em maior proporção no solo de pastagem contínua.

Figura 18. Análise estatística comparando os solos de pastagem contínua e plantio convencional.



As amostras de solo de plantio direto e plantio convencional, ao serem comparados, apresentaram diferença significativa apenas para o gênero *Agrobacterium*, estando entre presente em maior proporção no manejo de plantio direto.

Figura 19. Análise estatística comparando os solos de plantio direto e plantio convencional.



O gênero *Serpentinomonas* foi identificado, através da análise estatística, em maior proporção nas amostras de solo de mata nativa. Este dado está de acordo com o resultado do Interacti veen representado na Figura 12. que demonstrou que a espécie deste gênero foi exclusiva da mata nativa.

O gênero *Trichoderma* esteve presente em maior proporção nas amostras de solo de plantio direto e plantio convencional quando comparadas com mata nativa. Poucas espécies deste gênero são adaptadas a vida no solo, no entanto, algumas já foram identificadas colonizando raízes de plantas (Harman, 2012).

As amostras de solo de mata nativa e pastagem contínua apresentaram maior proporção de gênero *Burkholderia* quando comparada com as amostras de plantio direto e plantio convencional. Este gênero também já foi identificado em metagenômica de amostras de solo (Souza, 2013).

O gênero *Agrobacterium* foi encontrado em maior proporção nas amostras de solo de plantio direto quando comparadas com plantio convencional e mata nativa. Também foi identificada diferença significativa quando comparada as amostras de solo de pastagem contínua e plantio convencional. Este gênero já foi identificado em metagenômica de amostras de solo (Soni, 2016).

Brochothrix foi um gênero que foi identificado em maior proporção nas amostras de integração lavoura-pecuária e plantio convencional quando comparados com a mata nativa. Uko (2019) identificou este gênero em amostras de solo através de metagenômica.

6.8 Características físico-químicas da proteína *L-asparaginase* de *Friedmanniella luteola*

Após o processo de curagem, foi selecionada a sequência referente ao scaffold_165_2838_3856_-, com um tamanho de 338 aminoácidos e pertencendo ao solo de mata nativa. A sequência pertence ao microrganismo *Friedmanniella luteola*

Tabela 4. Resultado dos valores obtidos no software ProtParam

Parâmetro	pl	II	IA	GRAVY	CE	PM	Tamanho
	5,59	30,95	91,33	-0,087	16180	35724,52	338

pl – Ponto isoelétrico, II – Índice de instabilidade, IA – Índice alifático, GRAVY - Grand average of hydropathy, CE – Coeficiente de extinção, PM – Peso molecular, Tamanho – quantidade de aminoácidos.

A proteína apresentou um tamanho total de 338 aminoácidos com um peso molecular (PM) de 35724,52 kDa. O número total de átomos é de 5004 e a fórmula química foi determinada como $C_{1556}H_{2496}N_{462}O_{477}S_{13}$.

O ponto isoelétrico de uma proteína corresponde ao valor de pH onde as cargas negativas e positivas de uma proteína se anulam. O ponto isoelétrico teórico obtido foi de 5.59. Este valor de pH pode ser utilizado para processos de separação e purificação proteica. Era esperado que o pl teórico fosse um valor ácido devido à presença de uma maior quantidade de resíduos com cargas negativas, representando um total de 42, enquanto foram encontrados um total de 33 resíduos com cargas positivas.

O índice de instabilidade (II) é um parâmetro utilizado para estimar a estabilidade que a proteína terá em um tubo de ensaio. Foi determinado o valor de corte de 40, ou seja, valores de II acima de 40 representam que a proteína pode apresentar instabilidade enquanto valores abaixo de 40 determinam uma provável estabilidade proteica. O valor obtido foi de 30.95, podendo prever um comportamento estável da proteína *in vitro*.

Em relação ao índice alifático (IA), a proteína apresentou um valor de 91.33. Este índice representa o volume da proteína composto por cadeias laterais

alifáticas. Ikai (1980) determinou que existe uma correlação entre o IA e a termoestabilidade de uma proteína.

Grand Average of Hydropathy (GRAVY) a interação da proteína com a água. Variando de -2 a +2, valores positivos de GRAVY representam uma maior hidrofobicidade. O resultado encontrado de -0.087 demonstra uma característica hidrofílica.

O coeficiente de extinção (CE) indica a característica de absorção da luz em um determinado λ pela proteína e está diretamente relacionado com a quantidade de resíduos aromáticos presentes. Os valores obtidos foram de $16180 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm em água.

Joy (2019) avaliou os parâmetros de 15 L-asparaginases. O maior valor de PI encontrado foi de 5.84, de II foi de 33.93 e de IA foi de 91.

Aghaiypour (2017) encontrou uma diversa variedade nos valores físico-químicos de L-asparaginase avaliadas pelo software protparam. O GRAVY variou de -0,128 até 0,050. Já o pl teórico variou de 5,68 a 8,56.

Analizou *in vitro* parâmetros relacionados a L-asparaginase. A enzima foi mais estável em ambiente básico, e o pl determinado foi de 7,4 (Cammack, 1971)

6.9 Estrutura 3D da proteína L-asparaginase de *Friedmanniella luteola*

A modelagem apresentou uma confiança de 95.9% de acordo com o programa Phyre2. As figuras 20 e 21 estão representando a visualização da modelagem da proteína L-asparaginase que teoricamente é produzida pela bactéria *Friedmanniella luteola*.

Figura 20. Visualização da modelagem da proteína L-asparaginase produzida pela microrganismo *Friedmanniella luteola* realizada pelo programa Phyre2 exibida no programa EzMol no modelo de nuvem de elétrons.

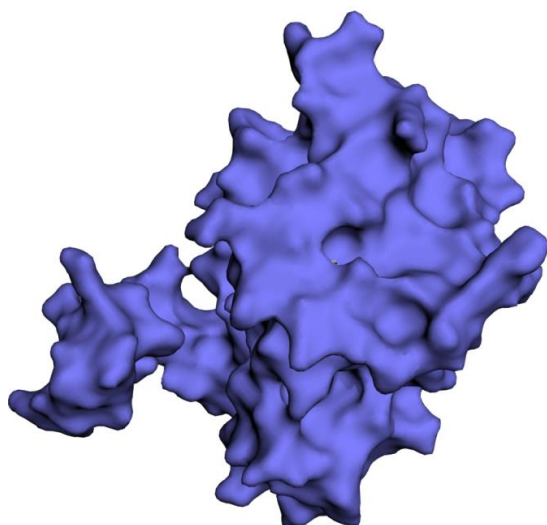
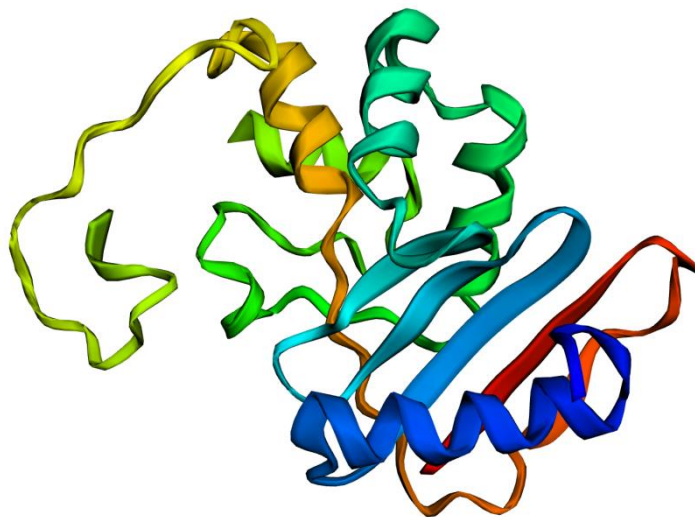


Figura 21. Visualização da modelagem da proteína L-asparaginase produzido pelo microrganismo *Friedmanniella luteola* realizada pelo programa Phyre2 exibida no programa EzMol no modelo cartoon.



Também foi possível observar a presença das estruturas secundárias alfa-hélice e folha beta pregueada.

7. Conclusões

O solo de integração lavoura-pecuária apresentou maior quantidade de sequências de DNA codificadoras de L-asparaginase, com um total de 1083 sequências. Em seguida foi o solo de pastagem contínua com 1050 sequências, seguido do plantio direto com 641 sequências, plantio convencional com 582 sequências e mata nativa com 383 sequências.

Os filos Firmicutes, Proteobacteria e Ascomycota foram os que ocorreram em maior quantidade nas amostras de solos, sendo a mata nativa o que apresentou maior diversidade de filos diferentes, o que foi confirmado em diferentes análises. A mata nativa foi a amostra que apresentou uma maior riqueza e abundância de espécies e diversidade de microrganismos produtores de L-asparaginase.

Os diferentes tipos de manejo de solo apresentaram diferentes características microbiológicas quanto a presença de espécies produtoras da enzima. São 12 espécies que ocorreram especificamente no solo de integração lavoura-pecuária, 12 no solo de plantio direto, 6 no plantio convencional e 8 na pastagem contínua. Um total de 14 espécies ocorreram em todos os solos.

A maioria das amostras de solos apresentaram diferenças estatísticas significativas principalmente entre mata nativa e plantio direto e mata nativa e plantio convencional.

Os dados corroboram a hipótese 1 de que existem diferenças significativas na presença de genes responsáveis pela expressão da enzima L-asparaginase em ao menos uma amostra de solo.

Referências Bibliográficas

ADHIKARI, S. et al. **A high-stringency blueprint of the human proteome. Nature Communications.** [S.l.]: Nature Research. , 1 dez. 2020

AGARWALA, R. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D8–D13, 1 jan. 2018.

Agrobacterium larrymoorei sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. [s.d.].

Agrobacterium vitis sp. nov. for Strains of *Agrobacterium* biovar 3 from Grapevines. [s.d.].

AGUIAR, L. M. et al. Metagenomic analysis reveals mechanisms of atrazine biodegradation promoted by tree species. **Environmental Pollution**, v. 267, 1 dez. 2020.

AGUIRRE-GARRIDO, J. F. et al. Metagenomic analyses uncover the differential effect of azide treatment on bacterial community structure by enriching a specific Cyanobacteria present in a saline-alkaline environmental sample. **International Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 467–474, 1 ago. 2020.

ALVARENGA ENG AGR DSC, R. C. et al. Integração Lavoura-Pecuária. 2007. AN INVESTIGATION OF THE BACILLUS PASTEURII. [s.d.].

ANTONELLI, F. et al. Characterization of black patina from the Tiber River embankments using next-generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, 1 jan. 2020.

ARIAS-CORDERO, E. et al. Comparative Evaluation of the Gut Microbiota Associated with the Below- and Above-Ground Life Stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, *Melolontha hippocastani*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 10 dez. 2012.

ARJUN, J. K. et al. Characterization of a novel asparaginase from soil metagenomic libraries generated from forest soil. **Biotechnology Letters**, v. 40, n. 2, p. 343–348, 1 fev. 2018.

ARTHURSON, V.; SESSITSCH, A.; JÄDERLUND, L. **Persistence and spread of Salmonella enterica serovar Weltevreden in soil and on spinach plants. FEMS Microbiology Letters.** [S.l: s.n.]. , jan. 2011

AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, 8 fev. 2008. BADALI, H. et al. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 175–191, 2008.

BAI, Y. et al. Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. **Nature**, v. 528, n. 7582, p. 364–369, 17 dez. 2015.

BANSAL, S. et al. Structural stability and functional analysis of L-asparaginase from *pyrococcus furiosus*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 3, p. 375–381, mar. 2010.

BARAJAS, H. R. et al. Testing the Two-Step Model of Plant Root Microbiome Acquisition Under Multiple Plant Species and Soil Sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 9 out. 2020.

BARBERÁN, A. et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. **ISME Journal**, v. 6, n. 2, p. 343–351, fev. 2012.

BARBOSA, C. S. et al. Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 3 jul. 2018.

BATOOL, T. et al. **A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. Applied Biochemistry and Biotechnology.** [S.l.]: Humana Press Inc. , 1 mar. 2016.

BENEDICT, R. G. et al. **STUDIES ON STREPTOMYCES GRISEOCARNEUS AND THE PRODUCTION OF HYDROXYSTREPTOMYCIN.** . [S.l: s.n.], [s.d.].

BENNO, Y.; WATABE, J.; MITSUOKA, T. *Bacteroides pyogenes* sp. nov., *Bacteroides suis* sp. nov., and *Bacteroides helcogenes* sp. nov., New Species from Abscesses and Feces of Pigs. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 396–407, 1983.

BERNAUER, L. et al. **Komagataella phaffii as Emerging Model Organism in Fundamental Research. Frontiers in Microbiology.** [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 11 jan. 2021

BONDARTSEVA, M. A. et al. **Punctularia strigosozonata (Punctulariaceae) in Europe. Karstenia.** [S.l: s.n.], 2000.

BOSSHARD, P. P.; ZBINDEN, R.; ALTWEGG, M. *Turicibacter sanguinis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, Gram-positive bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1263–1266, 2002.

BREITWIESER, F. P.; LU, J.; SALZBERG, S. L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1125–1139, 27 mar. 2018a.

A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1125–1139, 27 mar. 2018b.

BRETT, P. J.; DESHAZER, D.; WOODS, □□□ D E. **Characterization of Burkholderia pseudomallei and Burkholderia pseudomallei-like strains. Epidemiol. Infect.** [S.l: s.n.], 1997.

BRULAND, N. et al. *Pseudorhodoferax soli* gen. nov., sp. nov. and *Pseudorhodoferax caeni* sp. nov., two members of the class Betaproteobacteria belonging to the family Comamonadaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 2702–2707, 2009.

CACHUMBA, J. J. M. et al. **Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. Brazilian Journal of Microbiology.** [S.l.]: Elsevier Editora Ltda. , 1 dez. 2016

CARBONETTO, B. et al. Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 12 jun. 2014.

CARLOS BABUJIA, L. et al. Microbial diversity in an Oxisol under no-tillage and conventional tillage in southern Brazil 1 Diversidade microbiana em um Latossolo Vermelho sob plantio direto e convencional no sul do Brasil. v. 870, p. 863, 2014. Disponível em: <www.ccarevista.ufc.br>.

CARRO, L. et al. *Paenibacillus lupini* sp. nov., Isolated from nodules of *Lupinus albus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3028–3033, 1 set. 2014.

CECILIA BERIN, M. Dysbiosis in food allergy and implications for microbial therapeutics. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 2, 19 jan. 2021.

CHAND, S. et al. **A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. Biotechnology and Applied Biochemistry.** [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. , 1 jul. 2020

CHEN, Z. et al. Integrated metagenomics and molecular ecological network analysis of bacterial community composition during the phytoremediation of cadmium-contaminated soils by bioenergy crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 111–118, 1 nov. 2017.

CHERNOV, T. I.; TKHAKAKHOVA, A. K.; KUTOVAYA, O. v. Assessment of diversity indices for the characterization of the soil prokaryotic community by metagenomic analysis. **Eurasian Soil Science**, v. 48, n. 4, p. 410–415, 15 abr. 2015.

CHRISTENSEN, S. B. et al. **THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS PARVODICIN, A NOVEL GLYCOPEPTIDE FROM A NEW SPECIES, ACTINOMADURA PARVOSATA: DISCOVERY, TAXONOMY, ACTIVITY AND STRUCTURE ELUCIDATION.** . [S.l: s.n.], [s.d.].

Classification of *Proteus vulgaris* biogroup 3 with recognition of *Proteus hauseri* sp. nov., nom. rev. and unnamed *Proteus* genomospecies 4, 5 and 6. [s.d.].

CONG, B. et al. Diversity of Cultivable Microbes From Soil of the Fildes Peninsula, Antarctica, and Their Potential Application. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 3 set. 2020.

COPELAND, A. et al. Complete genome sequence of the orange-red pigmented, radioresistant *Deinococcus proteolyticus* type strain (MRPT). **Standards in Genomic Sciences**, v. 6, n. 2, p. 240–250, 2012.

CORDOVANA, M. et al. **First report of *Methylobacterium radiotolerans* bacteraemia identified by MALDI-TOF mass spectrometry.** **New Microbes and New Infections**. [S.I.]: Elsevier Ltd. , 1 jul. 2019

COX, A. D.; SAITO, M. A. Proteomic responses of oceanic *Synechococcus* WH8102 to phosphate and zinc scarcity and cadmium additions. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. DEC, 2013.

DANG, Z. et al. Metagenome profiling identifies potential biocontrol agents for *selaginella kraussiana* in New Zealand. **Genes**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2019.

DATTA, S. et al. **Metagenomic applications in microbial diversity, bioremediation, pollution monitoring, enzyme and drug discovery. A review.** **Environmental Chemistry Letters**. [S.I.]: Springer. , 1 jul. 2020.

DE HOOG, G. S. et al. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 219–234, 2007.

DE MANDAL, S. et al. Amplicon sequencing and imputed metagenomic analysis of waste soil and sediment microbiome reveals unique bacterial communities and their functional attributes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 12, 1 dez. 2019.

DEL DOT, T.; OSAWA, R.; STACKEBRANDT, E. *Phascolarctobacterium faecium* gen. nov, spec. nov., a Novel Taxon of the Sporomusa Group of Bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 380–384, 1993.

DIANOU, D. et al. Characterization of *Desulfovibrio* sp. isolated from some lowland paddy field soils of Burkina Faso. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 459–465, 1998.

DRZEWIECKA, D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 4, p. 741–758, 1 nov. 2016.

DWIVEDI, V. D.; MISHRA, S. K. In silico analysis of L-asparaginase from different source organisms. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 6, n. 2, p. 93–99, 2014.

EEVERS, N. et al. Draft genome sequence of *Methylobacterium radiotolerans*, a DDE-degrading and plant growth-promoting strain isolated from *Cucurbita pepo*. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, 2015.

EIKMEYER, F. G. et al. Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 3, p. 334–343, 2013.

ELOE-FADROSH, E. A. et al. **Global metagenomic survey reveals a new bacterial candidate phylum in geothermal springs.** **Nature Communications**. [S.I.]: Nature Publishing Group. , 27 jan. 2016

ENDO, A.; OKADA, S. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2195–2205, 2008.

ERDÖNMEZ, D.; RAD, A. Y.; AKSÖZ, N. Quorum sensing molecules production by nosocomial and soil isolates *Acinetobacter baumannii*. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 10, p. 1325–1334, 1 dez. 2017.

ESCOBEDO-HINOJOSA, W.; PARDO-LÓPEZ, L. Analysis of bacterial metagenomes from the Southwestern Gulf of Mexico for pathogens detection. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 5, 1 jul. 2017.

EVSTIGNEEVA, A. et al. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*. **Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 657–664, 2009.

FARUQUE JOY, Z.; HAKIM, A.; HASAN, M. **Screening for Alternative Sources of L-Asparaginase Used in Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL) Treatment: An In Silico Approach** **Phytophthora View project Xenobiotics View project**. . [S.l.: s.n.], 2019. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/332444086>>.

FATIMA, N.; KHAN, M. M.; KHAN, I. A. L-asparaginase produced from soil isolates of *Pseudomonas aeruginosa* shows potent anti-cancer activity on HeLa cells. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1146–1153, 1 set. 2019.

FEREIDOUNI, S. et al. Mass die-off of saiga antelopes, Kazakhstan, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 6, p. 1169–1176, 1 jun. 2019.

FERNANDES, É. K. K. et al. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, n. 3, p. 197–205, set. 2010.

FIALA, G.; STETTER, K. O. **Pyrococcus furiosus sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100~**. **Arch Microbiol.** [S.l.: s.n.], 1986.

FIERER, N. **Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome**. **Nature Reviews Microbiology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 out. 2017

FIGUERAS, M. J. et al. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 242–248, fev. 2011.

FLEMING, A. **ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZAE**. . [S.l.: s.n.], [s.d.].

FORSTER, S. C. et al. A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 186–192, 1 fev. 2019.

FRANCIS, J. R. Biocontrol potential and genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* lineage in agricultural habitats. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 2, p. 556–564, 1 ago. 2019.

GAO, Q. et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 1, 2011.

GARCIA-GARCERA, M. et al. Metagenomic assessment of the interplay between the environment and the genetic diversification of *Acinetobacter*. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 5010–5024, 1 dez. 2017.

GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MANZANO-AGUGLIARO, F. **The metagenomics worldwide research**. **Current Genetics**. [S.l.]: Springer Verlag. , 1 out. 2017

GHOSH, A.; MEHTA, A.; KHAN, A. M. Metagenomic analysis and its applications. **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics**. [S.l.]: Elsevier, 2018. v. 1–3. p. 184–193.

GRIBBLE, A.; BRIGHTWELL, G. Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campystris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. **Meat Science**, v. 94, n. 3, p. 361–368, jul. 2013.

GUNZER, F. et al. Whole-genome sequencing of a large collection of *Myroides odoratimimus* and *Myroides odoratus* isolates and antimicrobial susceptibility studies. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2018.

HARMAN, G. E. et al. Special issue: Trichoderma-from Basic Biology to biotechnology. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 1–2, jan. 2012.

HOVER, B. M. et al. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 415–422, 1 abr. 2018.

HUSON, D. H. et al. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome Research**, v. 17, n. 3, p. 377–386, mar. 2007. Identification of novel esterase from metagenomic library of Yangtze River. [s.d.].

IMHOFF, J. F. et al. New insights into the metabolic potential of the phototrophic purple bacterium *Rhodospila globiformis* DSM 161T from its draft genome sequence and evidence for a vanadium-dependent nitrogenase. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 6, p. 847–857, 1 ago. 2018.

INGEMAR OHLSSON, J. et al. Microbial community in hyperalkaline steel slag-fill emulates serpentinizing springs. **Diversity**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2019.

ISONO, D. M. **Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms**. **Journal of General Microbiologi**. [S.l: s.n.], 1973.

IWAI, K.; AISAKA, K.; SUZUKI, M. *Friedmanniella luteola* sp. nov., *Friedmanniella lucida* sp. nov., *Friedmanniella okinawensis* sp. nov. and *Friedmanniella sagamiharensis* sp. nov., isolated from spiders. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 113–120, 2010.

JARVIS, K. G. et al. Cilantro microbiome before and after nonselective pre-enrichment for *Salmonella* using 16S rRNA and metagenomic sequencing. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, 12 ago. 2015.

JENNINGS, M. P.; SCOTT, S. P.; BEACHAM, I. R. **Regulation of the ansB gene of Salmonella enterica**. **Molecular Microbiology**. [S.l: s.n.], 1993.

JHA, P. et al. Unveiling the Biodiversity of Hyperthermophilic Archaea in Jharia Coal Mines: Potential Threat to Methanogenesis? **Current Genomics**, v. 21, n. 5, p. 363–371, 6 jun. 2020.

JÜNEMANN, S. et al. **Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research**. **Journal of Biotechnology**. [S.l.]: Elsevier B.V. , 10 nov. 2017

KEBEISH, R. et al. Molecular cloning, biochemical characterization, and antitumor properties of a novel L-asparaginase from *Synechococcus elongatus* PCC6803. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 10, p. 1173–1181, 1 out. 2016.

KIM, S. J. et al. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, n. 1, p. 44–51, maio 2008.

Parafilimonas terrae gen. nov., sp. nov., isolated from greenhouse soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3040–3045, 1 set. 2014.

KOMATSUZAKI, M.; OHTA, H. Soil management practices for sustainable agro-ecosystems. **Sustainability Science**, v. 2, n. 1, p. 103–120, abr. 2007.

KONG, W. L. et al. Forest tree associated bacterial diffusible and volatile organic compounds against various phytopathogenic fungi. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, 1 abr. 2020.

KUDO, T. et al. Draft genome sequences of *Psychrobacter* strains JCM 18900, JCM 18901, JCM 18902, and JCM 18903, isolated preferentially from frozen aquatic organisms. **Genome Announcements**, v. 2, n. 2, 2014.

KULICHEVSKAYA, I. S. et al. *Fimbrioglobus ruber* gen. Nov., sp. nov., a gemmata-like planctomycete from Sphagnum peat bog and the proposal of gemmataceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 218–224, 1 fev. 2017.

LEE, M. H. et al. A new esterase EstD2 isolated from plant rhizosphere soil metagenome. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 1125–1134, nov. 2010.

Leuconostoc ficulneum sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. [s.d.].

LI, H. et al. Genome sequences of *Verticillium dahliae* defoliating strain XJ592 and nondefoliating strain XJ511. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 33, n. 4, p. 565–568, 2020.

LI, Q. R. et al. A novel *Trichoderma* species isolated from soil in Guizhou, T. guizhouense. **Mycological Progress**, v. 12, n. 2, p. 167–172, 1 maio 2013.

LI, S.; WU, F. Diversity and co-occurrence patterns of soil bacterial and fungal communities in seven intercropping systems. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, 6 jul. 2018.

LIANG, Y. et al. Metagenomic analysis of the diversity of DNA viruses in the surface and deep sea of the south China sea. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. AUG, 2019.

LIAQUAT, F. et al. Evaluation of metal tolerance of fungal strains isolated from contaminated mining soil of Nanjing, China. **Biology**, v. 9, n. 12, p. 1–12, 1 dez. 2020.

LIM, Y. W. et al. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 284–289, 2010.

LIOTTI, R. G.; DA SILVA FIGUEIREDO, M. I.; SOARES, M. A. *Streptomyces griseocarneus* R132 controls phytopathogens and promotes growth of pepper (*Capsicum annuum*). **Biological Control**, v. 138, 1 nov. 2019.

LIU, K. et al. *Pacificomonas flava* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Sphingomonadaceae isolated from the Southeastern Pacific. **Current Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 96–101, 2014.

LIU, N. et al. Metagenomic next-generation sequencing diagnosis of peripheral pulmonary infectious lesions through virtual navigation, radial EBUS, ultrathin bronchoscopy, and ROSE. **Journal of International Medical Research**, v. 47, n. 10, p. 4878–4885, 1 out. 2019.

LIU, Q. et al. The growth promotion of peppers (*Capsicum annuum* L.) by trichoderma guizhouense NJAU4742-based biological organic fertilizer: Possible role of increasing nutrient availabilities. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–23, 1 set. 2020.

LIU, Y. X. et al. **A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. Protein and Cell.** [S.l.]: Higher Education Press Limited Company. , 1 maio 2021

MADHAVAN, A. et al. Metagenome Analysis: a Powerful Tool for Enzyme Bioprospecting. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 2, p. 636–651, 1 out. 2017.

MADSEN, I. R.; JUSTESEN, U. S. Bacteremia with *Bacteroides pyogenes* after a cat bite. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3092–3093, ago. 2011.

MANCINI, S. et al. **Genome sequence of *Desulfovibrio* sp. A2, a highly copper resistant, sulfate-reducing bacterium isolated from effluents of a zinc smelter at the Urals.** **Journal of Bacteriology.** [S.l.: s.n.], dez. 2011

MARGESIN, R.; ZHANG, D. C. *Humitalea rosea* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium of the family Acetobacteraceae isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART4, p. 1411–1416, 1 abr. 2013.

MARTEINSSON, V. T. et al. ***Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent.** **Journal of Systematic Bacteriology.** [S.l.: s.n.], [s.d.].

MENDES, L. W. et al. Using Metagenomics to Connect Microbial Community Biodiversity and Functions. **Metagenomics: Current Advances and Emerging Concepts.** [S.l.]: Caister Academic Press, 2017. .

MENEGHINE, A. K. et al. Metagenomic analysis of soil and freshwater from zoo agricultural area with organic fertilization. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.

MIDHA, S. et al. Genomic resource of rice seed associated bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, 2016.

MOHITE, B. V.; PAWAR, S. P.; MORANKAR, A. Isolation, selection and biodegradation profile of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 2, p. 143–146, ago. 2011.

MUNEER, F. et al. **Microbial l-asparaginase: purification, characterization and applications.** **Archives of Microbiology.** [S.l.]: Springer. , 1 jul. 2020

NAKAMURA, K. et al. ***Microlunatus phosphovoms* gen. nov., sp. nov., a New Gram-Positive Polyphosphate-Accumulating Bacterium Isolated from Activated Sludge.** **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.** [S.l.: s.n.], 1995.

NAKULESHWAR, D. J. et al. Isolation and identification of microorganism from polyhouse agriculture soil of Rajasthan. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 41, p. 4886–4891, 11 out. 2013.

NAM, Y. J. et al. Metagenomic analysis of soil fungal communities on Ulleungdo and Dokdo Islands. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 67–74, 29 jul. 2015.

NG, I. S. et al. Copper response of *Proteus hauseri* based on proteomic and genetic expression and cell morphology analyses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 5, p. 1057–1072, 2014.

NZILA, A. et al. Isolation and characterization of naphthalene biodegrading *Methylobacterium radiotolerans* bacterium from the eastern coastline of the Kingdom of Saudi Arabia. **Archives of Environmental Protection**, v. 42, n. 3, p. 25–32, 1 set. 2016.

O'CUÍV, P. et al. Draft genome sequence of *Turicibacter sanguinis* PC909, isolated from human feces. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 5, p. 1288–1289, mar. 2011.

OSHKIN, I. Y. et al. *Granulicella sibirica* sp. Nov., a psychrotolerant acidobacterium isolated from an organic soil layer in forested tundra, West Siberia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1195–1201, 1 abr. 2019.

PANIGRAHI, S.; VELRAJ, P.; SUBBA RAO, T. Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation. **Microbial Diversity in the Genomic Era**. [S.I.]: Elsevier, 2018. p. 359–385.

PARKS, D.; BEIKO, R. STAMP: Statistical Analysis of Metagenomic Profiles. **Encyclopedia of Metagenomics**. [S.I.]: Springer New York, 2013. p. 1–6.

PEARCE, D. A. et al. Metagenomic analysis of a southern maritime Antarctic soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. DEC, 2012.

PELLETIER, D. A. et al. Genome Sequences of 42 Bacteria Isolated from Sorghum bicolor Roots. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 37, 10 set. 2020.

PENG, G. et al. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2158–2163, set. 2008.

PETERSON, R. E.; CIEGLER, A. **L-Asparaginase Production by Various Bacteria**. **APPLIED MICROBIOLOGY**. [S.I.: s.n.], 1969.

PFENNIG, N. *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a New Species of the **Rhodospirillaceae**. **Arch. Microbiol.** [S.I.]: Springer-Verlag, 1974. Physiological Ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., Isolated from the Hindgut of the Termite *Reticulitermes flavipes*. [s.d.].

POEHLEIN, A.; SEEDORF, H. Draft genome sequences of *Methanobrevibacter curvatus* DSM11111, *Methanobrevibacter cuticularis* DSM11139, *Methanobrevibacter filiformis* DSM11501, and *Methanobrevibacter oralis* DSM7256. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, 2016.

POTISAP, C. et al. *Burkholderia pseudomallei*-absent soil bacterial community results in secondary metabolites that kill this pathogen. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

PRAYOGO, F. A. et al. **Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review**. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. [S.I.]: Springer. , 1 dez. 2020

PYLRO, V. S. et al. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity-Challenges and Prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 1 fev. 2014.

QUINCE, C. et al. **Shotgun metagenomics, from sampling to analysis**. **Nature Biotechnology**. [S.I.]: Nature Publishing Group. , 12 set. 2017

RAMPELOTTO, P. H. et al. Changes in Diversity, Abundance, and Structure of Soil Bacterial Communities in Brazilian Savanna Under Different Land Use Systems. **Microbial Ecology**, v. 66, n. 3, p. 593–607, out. 2013.

RAVIN, N. v et al. **Genome Analysis of *Fimbriiglobus ruber* SP5 T , a Planctomycete with Confirmed Chitinolytic Capability**. . [S.I.: s.n.], 2018. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>.

Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) Strains to a New Genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. [s.d.].

REVISTA DE, A.; NEOTROPICAL, C.-M. **Sistema plantio direto e convencional: efeito na produtividade de fibra de três cultivares de algodoeiro**. . [S.I.: s.n.], 2016.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 15 nov. 2015.

RODRIGUES, E. M.; KALKS, K. H. M.; TÓTOLA, M. R. Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island, Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 156, p. 15–22, 1 jun. 2015.

SANTOS, T. M. A.; GILBERT, R.; BICALHO, R. C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 291–302, jan. 2011.

SAWADA, T. et al. **Microbial Resolution of *cx*-Hydroxy Acids by Enantiospecifically Dehydrogenating Bacteria from Soil**. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**. [S.l.: s.n.], 1983. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>. SCANLAN, D. J. **Physiological Diversity and Niche Adaptation in Marine Synechococcus**. [S.l.: s.n.], [s.d.].

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 5, 4 set. 2015.

SHEN, L. et al. *Massilia eurypsychrophila* sp. nov. a facultatively psychrophilic bacteria isolated from ice core. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2124–2129, 1 jul. 2015.

SINGH, J. et al. L-Asparaginase as a new molecular target against leishmaniasis: insights into the mechanism of action and structure-based inhibitor design. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1887–1896, 1 jul. 2015.

SMITH, T. J. et al. Genomic Characterization of Newly Completed Genomes of Botulinum Neurotoxin-Producing Species from Argentina, Australia, and Africa. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 229–242, 17 mar. 2020.

SOBAT, M. et al. Metagenomic discovery and functional validation of L-asparaginases with anti-leukemic effect from the Caspian Sea. **iScience**, v. 24, n. 1, 22 jan. 2021a.

Metagenomic discovery and functional validation of L-asparaginases with anti-leukemic effect from the Caspian Sea. **iScience**, v. 24, n. 1, 22 jan. 2021b.

SONG, A. A. L. et al. **A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory**. **Microbial Cell Factories**. [S.l.]: BioMed Central Ltd. , 4 abr. 2017

SONI, R. et al. Exploration of *nifH* gene through soil metagenomes of the western Indian Himalayas. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–4, 1 dez. 2016.

SOUILLARD, R. et al. Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013. **Avian Pathology**, v. 43, n. 5, p. 458–464, 25 set. 2014.

SOUZA, R. C. et al. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 106–112, 1 fev. 2015^a.

Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 106–112, 1 fev. 2015^b.

Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 49–61, out. 2013.

SURENDRA, V. et al. *Imtechella halotolerans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae isolated from estuarine water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 2624–2630, 1 nov. 2012.

SUZUKI, S. et al. Physiological and genomic features of highly alkaliphilic hydrogen-utilizing Betaproteobacteria from a continental serpentinizing site. **Nature Communications**, v. 5, 21 maio 2014.

SZOBOSZLAY, M.; TEBBE, C. C.; TEBBE, C. Hidden heterogeneity and co-occurrence networks of soil prokaryotic communities revealed at the scale of individual soil aggregates 2 Running title: Microbial diversity at soil aggregate-level 3. [s.d.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.06.24.169037>>.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, v. 7, n. 6, p. e577, 30 jun. 2017.

TONELLI FERNANDES, A. F. et al. Degradation of atrazine by *Pseudomonas* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from Brazilian agricultural soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 130, p. 17–22, 1 maio 2018.

TREJO, W. H. et al. **STREPTOMYCES LAURENTII, A NEW SPECIES PRODUCING THIOSTREPTON. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS**. [S.l: s.n.], [s.d.]. UKO, M. P.;

UMANA, S.; UDOTONG, I. **HOMOLOGY-DEPENDENT METAGENOMICS STUDY OF AGRICULTURAL SOILS IN AKWA IBOM STATE, NIGERIA** Environmental Studies View project I am Embarking on a Book Project Titled “**BIOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBON AND OTHER HAZARDOUS MATERIALS (HAZMAT) POLLUTED SITES**” View project. . [S.l: s.n.], [s.d.]. Disponível em: <www.jbino.com>.

URAMOTO, K. et al. **Quantitative Analysis and Distribution of the Population of Species in the Genus Anastrepha (Diptera: Tephritidae) on Luiz de Queiroz**. . [S.l: s.n.], [s.d.].

VALDEZATE, S. et al. First Insight into the Genome Sequences of Two Linezolid-Resistant *Nocardia farcinica* Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/genomeA>>.

VAN ELSAS, J. D. et al. **The metagenomics of disease-suppressive soils - experiences from the METACONTROL project. Trends in Biotechnology**. [S.l: s.n.], , nov. 2008

VEJARANO, F. et al. Complete Genome Sequence of *Thalassococcus* sp. Strain S3, a Marine Roseobacter Clade Member Capable of Degrading Carbazole . **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 28, 11 jul. 2019.

VELU, G.; NALLAPETA, S.; R MULA, R. v. **Green house gas emissions from termite ecosystem. African Journal of Environmental Science and Technology**. [S.l: s.n.], 2011. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJEST>>.

VERCE, M. et al. A Combined Metagenomics and Metatranscriptomics Approach to Unravel Costa Rican Cocoa Box Fermentation Processes Reveals Yet Unreported Microbial Species and Functionalities. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 16 fev. 2021.

VOLKOV, I. et al. Neutral theory and relative species abundance in ecology. **Nature**, v. 424, n. 6952, p. 1035–1037, 28 ago. 2003.

WANG, Y. M. et al. **a novel actinomycete from the tropical rainforest of Singapore. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. [S.l: s.n.], 2001.

WILTSCHI, B. et al. **Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. Biotechnology Advances**. [S.l.]: Elsevier Inc. , 1 maio 2020

WU, D. K. et al. Metabolites from carnivorous fungus *Arthrobotrys entomopaga* and their functional roles in fungal predatory ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 4108–4113, 1 maio 2013.

WU, L. et al. Comparative metagenomic analysis of rhizosphere microbial community composition and functional potentials under *rehmannia glutinosa* consecutive monoculture. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 14 ago. 2018.

XU, L. et al. Genomic-based taxonomic classification of the family erythrobacteraceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4470–4495, 2020.

XU, X. et al. Amplicon-based metagenomics identified candidate organisms in soils that caused yield decline in strawberry. **Horticulture Research**, v. 2, 2015.

XUE, L. et al. Soil bacterial community structure and co-occurrence pattern during vegetation restoration in karst rocky desertification area. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 1 dez. 2017.

YOON, J. H. et al. *Phycoccus dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 597–600, mar. 2008.

YU, E. Y. et al. Isolation and characterization of cold-active family VIII esterases from an arctic soil metagenome. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 573–581, abr. 2011.

YUAN, L. J. et al. Actinopolymorpha cephalotaxi sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of the plant Cephalotaxus fortunei. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 51–54, 2010.

ZHANG, D.; MARGESIN, R. Characterization of culturable heterotrophic bacteria in hydrocarbon-contaminated soil from an alpine former military site. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1717–1724, 2014.

ZHANG, X. X. et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing for identifying Streptococcus pneumoniae in paediatric bacterial meningitis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 4 jun. 2019.

ZHORZHOLIANI, E. et al. **Spread of Clostridium botulinum in the soils of Georgia**. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <<http://ojphi.org>>.

ZHU, Y. et al. Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. **Microbiological Research**, v. 168, n. 9, p. 589–597, 7 nov. 2013.

RISSI, Daniel Vasconcelos. Análise metagenômica de solos sob floresta semidecidual e sistema plantio direto. 2015. 41 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Fcba, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/handle/prefix/4134>. Acesso em: 23 jul. 2021.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

Kelley LA et al. Nature Protocols 10, 845-858 (2015)

Reynolds CR, Islam SA, Sternberg MJE (2018). “EzMol: A web server wizard for the rapid visualisation and image production of protein and nucleic acid structures.” J Mol Biol

Lang S. Über desamidierung im Tierkörper. Beitr Chem Physiol Pathol. 1904;5:321–345

Furth O, Friedmann M. Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente. Biochemistry. 1910;26:435–440.

Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6579, Acrylamide. Retrieved December 7, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acrylamide>.

NCBI Resource Coordinators, Database resources of the National Center for Biotechnology Information, Nucleic Acids Research, Volume 46, Issue D1, 4 January 2018, Pages D8–D13, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>

Heberle, H.; Meirelles, G. V.; da Silva, F. R.; Telles, G. P.; Minghim, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. BMC Bioinformatics 16:169 (2015).

Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. Bioinformatics, 30, 3123-3124

Huson, H.; Auch; Ji Qi; S. C. Schuster (2007). "MEGAN Analysis of Metagenomic Data". Genome Research. 17 (3): 377–386. doi:10.1101/gr.5969107. PMC 1800929. PMID 17255551. Retrieved April 3, 2008.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005).pp. 571-607

ARJUN, Jaya; ANEESH, Balakrishna; KAVITHA, Thulasi; HARIKRISHNAN, Kumarapillai. Characterization of a novel asparaginase from soil metagenomic libraries generated from forest soil. **Biotechnol Lett**, [S. l.], p. 343-348, 10 nov. 2017.

AGHAIYPOUR, Khosrow; BAHREINI, Elham; JAFARI, Shiva. Bioinformatic Analysis of L-Asparaginase II from Citrobacter Freundii 1101, Erwinia Chrysanthemii DSM 4610, E.coli BL21 and

Klebsiella Pneumoniae ATCC 10031. **International Journal of Medical Laboratory**, [S. l.], p. 123-134, 25 jun. 2017.

GHOSH, Shreya; DAS, Alok. Metagenomic insights into the microbial diversity in manganesecontaminated mine tailings and their role in biogeochemical cycling of manganese. **Scientific Reports**, [S. l.], p., 29 maio 2018.

CAMMACK, K; MARLBOROUGH, D; MILLER, D. Physical Properties and Subunit Structure of L-Asparaginase Isolated from Erwinia carotovora. **Biochem J**, [S. l.], p. 361-379, 3 ago. 1972.