

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Bacharel em Biotecnologia

MATEUS MARQUES SOUZA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA ENZIMA ALFA-AMILASE EM QUATRO
DIFERENTES TIPOS DE MANEJO DE SOLO E MATA NATIVA**

DOURADOS – MS

2024

MATEUS MARQUES SOUZA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA ENZIMA ALFA-AMILASE EM QUATRO
DIFERENTES TIPOS DE MANEJO DE SOLO E MATA NATIVA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado a
Universidade Federal da Grande Dourados como
Requisito parcial à obtenção do título de bacharel
em Biotecnologia

Orientador Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

DOURADOS – MS

2024

MATEUS MARQUES SOUZA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA ENZIMA ALFA-AMILASE EM QUATRO
DIFERENTES TIPOS DE MANEJO DE SOLO E MATA NATIVA**

Trabalho de Conclusão de curso aprovado
Pela Banca Examinadora como requisito
Para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia da Universidade Federal
Da Grande Dourados.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO MATHEUS PEREIRA**
Data: 11/07/2024 11:05:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO SIMOES RIBEIRO LEITE**
Data: 12/07/2024 10:54:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite – Universidade Federal da Grande Dourados

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA GOMES DA SILVA DANTAS**
Data: 11/07/2024 22:45:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Fabiana Gomes da Silva Dantas – Universidade Federal da Grande
Dourados

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S729a Souza, Mateus Marques
ANÁLISE METAGENÔMICA DA ENZIMA ALFA-AMILASE EM QUATRO
DIFERENTES TIPOS DE MANEJO DE SOLO E MATA NATIVA [recurso eletrônico] /
Mateus Marques Souza. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Matheus Pereira.
TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Bioinformática. 2. Hidrolase. 3. Ecologia microbiana. 4. Pereira, Rodrigo Matheus. 5.
Título. I. Pereira, Rodrigo Matheus. II. Título.

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

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

Dedico a minha família.

Pelo incentivo incondicional durante a graduação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha gratidão à minha família, especialmente aos meus pais, Francisco e Roseli, que com muita dedicação e amor me ensinaram a perseguir meus sonhos. Se hoje me tornei quem sou, devo isso à educação que vocês me proporcionaram. A maior bênção de Deus em minha vida foi tê-los como pai e mãe.

Minha gratidão se estende a todas as pessoas que conheci durante a graduação, em especial a Fran, Fabricio, Gabrielli, Raphael e Viviane, que sempre estiveram presente ao longo desses anos. Muito obrigado por toda a amizade e companheirismo. O apoio de vocês foi essencial para eu concluir essa jornada.

Agradeço ao meu orientador, Rodrigo Matheus Pereira, por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas e por todos os ensinamentos na área de bioinformática. Também sou grato ao grupo de estudos pelo compartilhamento de conhecimento.

Agradeço à Universidade Federal da Grande Dourados pelo conhecimento adquirido durante esses anos de graduação e pelas oportunidades oferecidas. A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

As enzimas são vitais como biocatalisadores em diversas indústrias, impulsionando pesquisas por novas enzimas para aprimorar processos e sustentabilidade. A α -amilase uma endo-amilase e hidrolisa ligações alfa 1,4 internas a molécula de amido, apresentando como produto principal dextrinas (oligossacarídeo) lineares e ramificados. As amilases representam 30% da produção global de enzimas, com destaque na indústria alimentícia pela modificação do amido. Neste estudo, o foco foi investigar possíveis variações na comunidade microbiana envolvida na produção de α -amilase em amostras de solo sujeitas a diferentes práticas de manejo e mata nativa. O estudo de campo foi conduzido na Embrapa Agropecuária Oeste, situada em Dourados, MS, onde amostras de solo foram coletadas em diferentes áreas representando a mata nativa e quatro tipos de manejos distintos: pastagem contínua, plantio direto, integração lavoura-pecuária e plantio convencional. Foram utilizadas as sequências de DNA originadas do sequenciamento NGS pelo método Shotgun para alinhamento local com banco de dados formatado para a enzima α -amilase a partir do banco de dados Identical protein groups. A análise metagenômica permitiu explorar a diversidade microbiana e suas capacidades enzimáticas sem depender do cultivo laboratorial. Os resultados foram analisados nos softwares MEGAN, STAMP e Interacti-Venn onde foi possível fazer análises taxonômicas, a verificação dos microrganismos que produzem a enzima α -amilase, e análise estatística par-a-par das amostras de solo. A enzima α -amilase foi encontrada em todas as amostras de solos, obtendo-se diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tipos de manejo do solo, que foram analisadas a nível de filo e espécie.

Palavras-chave: Bioinformática; Hidrolase; Ecologia microbiana

ABSTRACT

Enzymes are vital as biocatalysts in various industries, driving research for new enzymes to improve processes and sustainability. α -Amylase is an endo-amylase that hydrolyzes internal α -1,4 linkages in the starch molecule, with the main product being linear and branched dextrans (oligosaccharides). Amylases account for 30% of global enzyme production, with a significant role in the food industry due to starch modification. In this study, the focus was on investigating potential variations in the microbial community involved in α -amylase production in soil samples subjected to different management practices and native forest. The field study was conducted at Embrapa Agropecuária Oeste, located in Dourados, MS, where soil samples were collected from different areas representing native forest and four distinct management types: continuous pasture, no-till farming, crop-livestock integration, and conventional farming. DNA sequences generated from NGS sequencing using the Shotgun method were used for local alignment with a database formatted for the α -amylase enzyme from the Identical Protein Groups database. The metagenomic analysis allowed for the exploration of microbial diversity and their enzymatic capabilities without relying on laboratory cultivation. The results were analyzed using MEGAN, STAMP, and Interacti-Venn software, where it was possible to conduct taxonomic analyses, verify microorganisms producing the α -amylase enzyme, and perform pairwise statistical analysis of soil samples. The α -amylase enzyme was found in all soil samples, with significant statistical differences observed among the different soil management types, which were analyzed at the phylum and species levels.

Keywords: Bioinformatics; Hydrolase; Microbial Ecology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma: Etapas gerais da metodologia. Os tratamentos de dados da etapa 1 foram realizados em um estudo anterior. **Página 21.**

Figura 2. Análise de abundância heatmap gerado pelo programa MEGAN a nível de filo. Solo 1: Mata Nativa; Solo 2: Pastagem Contínua; Solo 3: Plantio Direto; Solo 4: Integração Lavoura Pecuária; Solo 5: Plantio Convencional. **Página 28.**

Figura 3. Análise de abundância heatmap gerado pelo programa MEGAN a nível de espécies. Solo 1: Mata Nativa; Solo 2: Pastagem Contínua; Solo 3: Plantio Direto; Solo 4: Integração Lavoura Pecuária; Solo 5: Plantio Convencional. **Página 29.**

Figura 4. Análise do mapeamento das amostras em diferentes dimensões e similaridade das comunidades biológicas (PCoA) gerada pelo programa MEGAN, calculada através do método de distâncias Bray Curtis. **Página 31.**

Figura 5. Análise de cluster (UPGMA) gerada pelo programa MEGAN onde uma maior ramificação indica menor similaridade entre as amostras de solos. **Página 32.**

Figura 6. Curva de rarefação da avaliação da diversidade taxonômica em relação aos filios nas cinco amostras de solos em relação às sequências de α -amilase. Geradas pelo programa MEGAN nas cinco amostras de solo. **Página 33.**

Figura 7. Diagrama de Venn de interação das espécies de microrganismos produtores da enzima α -amilase comuns a todas as amostras e exclusivos de cada amostra. Solo 1: Mata Nativa; Solo 2: Pastagem Contínua; Solo 3: Plantio Direto; Solo 4: Integração Lavoura Pecuária; Solo 5: Plantio Convencional. **Página 34.**

Figura 8. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Mata Nativa e Plantio Direto. **Página 38.**

Figura 9. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Mata Nativa e Plantio Direto. **Página 39.**

Figura 10. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Mata Nativa e Integração Lavoura Pecuária. **Página 40.**

Figura 11. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Mata Nativa e Plantio Convencional. **Página 41.**

Figura 12. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Pastagem Contínua e Plantio Direto. **Página 42.**

Figura 13. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Integração Lavoura Pecuária e Pastagem Contínua. **Página 43.**

Figura 14. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Pastagem Contínua e Plantio Convencional. **Página 44.**

Figura 15. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Integração Lavoura Pecuária e Plantio Direto. **Página 45.**

Figura 16. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos de Plantio Convencional e Plantio Direto. **Página 46.**

Figura 17. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional. **Página 47.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidade de sequências de DNA de microrganismos que produzem enzima α -amilase e *ORFs nas 5 amostras de solo. **Página 25.**

Tabela 2- Índices de Diversidade de Shannon-Weaver das cinco amostras de solo obtidas no *software* MEGAN. **Página 26.**

Tabela 3. Lista de espécies comuns a todas as amostras de solo e das espécies presentes exclusivamente em cada amostra de solo. **Página 35.**

LISTA DE ABREVIACÕES

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ORF – *Open Read Frame*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

WGS – *Whole Genome Sequence*

NGS – *Next Generation Sequencing*

Solo 1 – Mata Nativa

Solo 2 – Pastagem Contínua

Solo 3 – Plantio Direto

Solo 4 – Integração Lavoura-Pecuária

Solo 5 – Plantio Convencional

Blast – *Basic Local Alignment Search Tool*

MEGAN- *Metagenome Analyzer*

PCoA – *Principal coordinate analysis*

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

STAMP – *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Enzima α -Amilase (EC 3.2.1.2)	14
3.2 Diversidade Microbiana do Solo.....	15
3.3 Manejo do Solo	16
3.4 Bioinformática.....	18
3.5 Metagenômica.....	19
4. METODOLOGIA	21
4.1 Amostragem do Solo.....	21
4.2 Extração do DNA.....	22
4.3 Sequenciamento do DNA.....	22
4.4 Formatação do Banco de Dados Local	22
4.5 Alinhamento Local.....	23
4.6 Análise de dissimilaridade genética	23
4.7 Análise Estatística	24
4.8 Diagrama de Venn	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Abundância	24
5.2 Índice de Diversidade.....	25
5.3 Heatmap.....	26
5.4 PCoA.....	30
5.5 UPGMA	31
5.6 Curva de Rarefação	32
5.7 Interacti-Venn	34
5.8 Análise Estatística	38
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A α -amilase é uma enzima classificada como metaloenzima rica em cálcio, desempenha um papel vital no processo digestivo, fragmentando polissacarídeos em unidades menores, tais como glicose e maltose. Seu mecanismo catalítico é fundamental para a eficiente quebra dessas moléculas complexas, facilitando a absorção de nutrientes pelo organismo (KAUR et al., 2021). A α -amilase tem recebido grande destaque devido à sua versatilidade de aplicação e aos benefícios econômicos associados a ela (BANSODE et al., 2010). É uma das enzimas mais valiosas e amplamente utilizadas pelas indústrias que dependem do processamento de amido em seus procedimentos produtivos. Essa enzima possui uma variedade de aplicações em setores como alimentício, de fermentação, têxtil, farmacêutico e outros (AHMAD et al., 2019). Sua capacidade de quebrar amido em açúcares fermentáveis a torna uma ferramenta valiosa para melhorar processos de produção e eficiência, contribuindo notavelmente para o impacto nas indústrias tanto em termos econômicos quanto de sustentabilidade (SUNDARRAM et al., 2014).

O solo detém bilhões de microrganismos que desempenham papéis essenciais na quebra e reciclagem da matéria orgânica, no ciclo de nutrientes e na transferência de energia nos ecossistemas terrestres. A saúde do solo é fundamental para o funcionamento de ecossistemas vivos que sustentam interações benéficas entre plantas, animais e microrganismos. A qualidade do solo é diretamente afetada pelas práticas agrícolas e está sendo cada vez mais reconhecida como fundamental para a nutrição humana (BLUM et al 2019).

A metagenômica surgiu como uma poderosa ferramenta para estudar comunidades microbianas, permitindo investigar organismos que não podem ser cultivados em laboratório de forma convencional. Essa abordagem oferece a oportunidade de descrever a diversidade microbiana em ambientes onde muitos organismos ainda não podem ser cultivados. Na metagenômica, o DNA é extraído de uma comunidade microbiana, representando todos os genomas presentes nessa comunidade. As bibliotecas metagenômicas resultantes são então analisadas por meio do sequenciamento de DNA, permitindo o estudo detalhado da diversidade genética e funcional das comunidades microbianas presentes nos ambientes estudados (NAZIR et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Geral

- Identificar taxonomicamente os microrganismos que produzem a enzima α -amilase nas amostras de solos sob diferentes manejos agrícolas e mata nativa de Dourados MS.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os microrganismos nos diferentes tipos de solo;
- Verificar a ocorrência dos genes que expressam a enzima α -amilase nas amostras de solos.
- Analisar a diferença estatística entre as populações de microrganismos produtores de α -amilase significativas nos diferentes tipos de manejos de solos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzima α -Amilase (EC 3.2.1.2)

As enzimas desempenham um papel fundamental como biocatalisadores, acelerando reações bioquímicas em uma variedade de setores industriais, incluindo têxteis, alimentos, detergentes, papel e bebidas. O interesse global dos pesquisadores tem sido despertado pela diversidade de benefícios proporcionados pelas enzimas, levando ao desenvolvimento e exploração contínuos de novas enzimas com potencial aplicação industrial (PRAYOGO et al., 2020). Essa busca incessante por enzimas mais eficientes e versáteis visa aprimorar processos industriais, aumentar a sustentabilidade e promover avanços significativos em diversos campos.

A α -amilase é uma metaloenzima essencial no processo de digestão, atuando na quebra de moléculas de polissacarídeos em unidades menores, como glicose e maltose. Sua presença e atividade são fundamentais para a eficiente degradação dos carboidratos complexos presentes nos alimentos, facilitando sua absorção pelo organismo e fornecendo a energia necessária para o funcionamento adequado do corpo humano (KAUR et al., 2021). As aplicações da α -amilase na biotecnologia são vastas e abrangem diversos setores industriais. Ela é amplamente utilizada no processamento de amido, na produção de biocombustíveis, e nas indústrias

alimentícias, de papel, têxteis e de detergentes. Além disso, essa enzima desempenha um papel importante na biorremediação de poluentes ambientais, ajudando na degradação de compostos orgânicos nocivos. Suas propriedades também são exploradas em aplicações clínicas e médicas (JUJJAVARAPU et al., 2019). O amplo espectro de aplicações da α -amilase destaca sua versatilidade e importância na biotecnologia moderna.

As Amilases são uma classe de enzimas industriais de grande relevância, representando cerca de 30% da produção global de enzimas (MOBINI-DEHKORDI et al., 2012). Sua importância é evidente na indústria de alimentos, onde desempenham um papel crucial na modificação e processamento de amido em uma variedade de produtos alimentícios. Além disso, essas enzimas são amplamente utilizadas em outras indústrias, como a de bebidas, papel e têxteis, devido à sua capacidade de catalisar reações que envolvem a quebra de polissacarídeos. A alta demanda por α -amilase na indústria é reflexo de sua eficácia e versatilidade em uma ampla gama de aplicações industriais (PATIL et al., 2021).

O êxito no uso de enzimas, especialmente na indústria, requer um equilíbrio preciso entre a quantidade de enzima necessária, as condições operacionais e os rendimentos de reação. O avanço na técnica de imobilização tem possibilitado a redução da quantidade de enzimas necessárias em processos, graças à capacidade de reciclagem de catalisadores. Isso não apenas otimiza a eficiência, mas também contribui para uma abordagem mais sustentável nos processos enzimáticos (VITOLLO et al., 2020).

3.2 Diversidade Microbiana do Solo

Os solos desempenham um papel vital no fornecimento de serviços ecossistêmicos aos seres humanos, como diversidade funcional, alimentos e fontes de bioenergia (DE VRIES et al., 2013). A variedade de organismos vivos presentes no solo é vasta em termos de diversidade taxonômica, estratégias de sobrevivência e funções desempenhadas (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2018). Os microrganismos, são formas de vida abundantes no planeta, dominam a diversidade genética global. A atividade da microbiota do solo desencadeia transformações vitais nos ciclos biogeoquímicos, incluindo a reciclagem de matéria orgânica, degradação de

substâncias estranhas, fixação de nitrogênio atmosférico e emissão de gases relacionados ao efeito estufa, revelando tanto conhecimentos estabelecidos quanto descobertas em potencial (LAMBAIS et al., 2005).

No solo, a um vasto mundo microscópico, dominado por bactérias e fungos. Estes microrganismos, presentes em números impressionantes, moldam a microbiota do solo. A contagem revela uma estimativa surpreendente: de 2.000 a 8,3 milhões de bactérias e cerca de 1,0 milhão de fungos podem habitar em um grama de solo (SABIR et al., 2021). Esses números destacam a importância desses microrganismos na fertilidade do solo, desempenhando papéis cruciais na ciclagem de nutrientes e na decomposição da matéria orgânica. De acordo com Janssen (2006) as bactérias do solo são classificadas em 100 filos distintos, entre esses numerosos grupos, apenas alguns reinam supremos em termos de abundância: Proteobactérias, Actinobactérias, Acidobactérias, Chloroflexi e Planctomycetes emergem como os principais protagonistas desse ecossistema microbiano.

A análise da microbiota do solo emerge como uma ferramenta fundamental para acompanhar mudanças nas suas funções, uma vez que os microrganismos desempenham um papel crucial na ciclagem de nutrientes. Essa abordagem oferece um indicador sólido para avaliar os esforços de restauração ecológica, destacando a importância dessa interação entre os organismos do solo e seu ambiente (SILVA et al., 2019).

3.3 Manejo do Solo

O manejo do solo abrange uma variedade de técnicas e práticas destinadas a otimizar a produção agrícola e maximizar o potencial produtivo do solo. Dentre essas estratégias, destacam-se os diferentes métodos de preparo do solo, cada qual projetado para aprimorar sua qualidade e sustentabilidade. Essas abordagens variam desde a aração e a gradagem até técnicas mais modernas, como a agricultura de conservação e o plantio direto. Cada técnica tem seu papel único na promoção da saúde do solo, na conservação da água e na maximização da produtividade agrícola, adaptando-se às necessidades específicas de cada região e cultura agrícola (DONAGEMMA et al., 2016).

O microbioma desempenha um papel crucial nos ecossistemas do solo, exercendo influência significativa sobre uma ampla gama de processos. Essas comunidades microbianas são essenciais para a regulação da troca de gases e nutrientes entre o solo e a atmosfera, podendo influenciar diretamente a acidez ou alcalinidade do meio. Além disso, desempenham um papel vital nos ciclos de nutrientes, contribuindo para a decomposição da matéria orgânica e a reciclagem de elementos essenciais, um aspecto particularmente importante é a capacidade dos microrganismos de fixar o nitrogênio atmosférico, fornecendo uma fonte vital deste nutriente para as plantas (FIERER et al., 2017). Assim, o microbioma do solo emerge como um elemento fundamental na sustentabilidade e na produtividade dos ecossistemas terrestres.

O sistema de manejo de Pastagem Contínua é uma abordagem que implica em manter o gado em uma única área de pastagem por um período prolongado, sem dividir a área em piquetes, esta prática tem sido reconhecida por seus benefícios ambientais e agronômicos. Ao permitir que a vegetação se recupere de maneira uniforme e contínua, o manejo contínuo da pastagem ajuda a melhorar a qualidade do solo, promovendo maior cobertura vegetal e reduzindo os efeitos da erosão. Além disso, a deposição constante de resíduos orgânicos, como excrementos e urina dos animais, enriquece o solo com nutrientes essenciais, contribuindo para aumentar sua fertilidade ao longo do tempo (MURPHY et al., 2020). Esse sistema de manejo sustentável demonstra como a integração entre atividade pecuária e conservação do solo pode resultar em benefícios mútuos tanto para o ambiente quanto para a produção agrícola (BONO et al., 2013).

Os sistemas de plantio direto e convencional, destacam-se pelas suas diferenças no preparo do solo e os resultados obtidos. No sistema convencional, o solo é preparado com técnicas como aração e gradagem, visando melhorar suas características, porém com custos elevados e impactos negativos na fertilidade e erosão do solo. Por outro lado, no plantio direto, não há preparo do solo, mantendo-o coberto por vegetação para proteção física, o que resulta em melhorias químicas e biológicas do solo, apesar do emprego de herbicidas, e desafios como enraizamento raso e aumento da umidade (KORUCU et al., 2009).

Os sistemas de integração lavoura-pecuária são definidos pela utilização simultânea de atividades agrícolas e pecuárias em uma mesma área. Isso pode envolver o uso de animais no local para beneficiar a produção agrícola ou o aproveitamento de terras agrícolas para suportar a criação de gado. Esses sistemas são essenciais para a agricultura em nível global, sendo adotados por mais de dois terços dos agricultores do mundo e contribuindo com aproximadamente metade da produção mundial de alimentos (HERRERO et al., 2010).

3.4 Bioinformática

Na década de 1980 o termo bioinformática foi usado pela primeira vez, a fim de descrever a aplicação da ciência e tecnologia da informação nas ciências da vida (RAMSDEN et al., 2023). Utilizando ferramentas computacionais na exploração de dados biológicos é fundamental diante da vasta quantidade de informações provenientes de experimentos de metagenômica, softwares especializados desempenham um papel crucial ao permitir análises adaptadas aos objetivos específicos de cada pesquisa, facilitando a interpretação e extração de insights valiosos (PRAYOGO et al., 2020). Essa integração entre biologia e computação desempenha um papel fundamental na compreensão dos sistemas biológicos complexos e na descoberta de padrões e relações ocultas nos dados.

A bioinformática, uma área multidisciplinar que integra biologia, ciência da computação e tecnologia da informação, está na vanguarda da pesquisa científica atual. O contínuo progresso nesse domínio impulsionou o desenvolvimento de diversas ferramentas, alimentadas por extensas bases de dados e algoritmos inovadores. Essas ferramentas capacitam os cientistas a preverem não apenas as estruturas das proteínas, mas também suas características biológicas, funções e epítomos, ampliando significativamente nosso entendimento e capacidade de intervenção em sistemas biológicos complexos (FOROUTAN et al., 2018).

Nos últimos anos, houve um surgimento e a rápida evolução de uma técnica de sequenciamento, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), essa ascensão tem sido marcada por uma série de melhorias significativas, incluindo o aumento no comprimento das leituras, redução dos gastos associados e um aumento no tamanho de dados sequenciados. Ferramentas como Hiseq, Miseq e Nextseq, da Illumina,

juntamente e Ion PGM/Proton da Thermo-Fisher, elas são amplamente utilizadas em uma variedade de aplicações, desde o sequenciamento completo do genoma até o sequenciamento do transcriptoma e estudos de metagenômica (BANERJEE et al., 2019).

Cada tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) possui suas particularidades, o processo de preparação de uma biblioteca NGS se inicia com a fragmentação do material inicial. Em seguida, são ligados adaptadores de sequência aos fragmentos para permitir o enriquecimento dessas moléculas. Uma biblioteca de alta qualidade deve ser altamente sensível e específica. Isso implica que todos os fragmentos de interesse devem estar representados de forma equitativa na biblioteca, sem a presença de produtos não específicos ou erros aleatórios (PEREIRA et al., 2020).

O software MEGAN Community Edition oferece uma variedade de análises para dados metagenômicos, e realiza análises taxonômicas e funcionais de leituras sendo amplamente utilizado para facilitar a análise interativa do conteúdo taxonômico e funcional em conjuntos de dados de microbioma de grande escala (HUSON et al., 2016) Este software é utilizado para explorar e interpretar a composição taxonômica e funcional de amostras metagenômicas, fornecendo insights importantes sobre a diversidade e as funções dos microbiomas em estudo.

O software STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) foi desenvolvido para executar análises estatísticas em dados metagenômicos. Seu principal propósito é determinar se existem diferenças significativas entre as amostras analisadas, permitindo avaliar se os resultados corroboram a hipótese nula ou a hipótese alternativa (PARKS et al., 2013). Este programa é uma ferramenta essencial para investigar e interpretar padrões e variações em comunidades microbianas com base em dados de sequenciamento de amplo espectro.

3.5 Metagenômica

Em 1998 o termo “Metagenômica” foi utilizado pela primeira vez, para descrever a análise de material genético da microbiota do solo obtido de amostras ambientais (FADIJI et al., 2020). Essa abordagem revolucionária permite a investigação da

diversidade genética e funcional de comunidades microbianas em seus habitats naturais, oferecendo insights valiosos sobre os ecossistemas e os processos biológicos que neles ocorrem (ZHANG et al., 2021). Desde então, a metagenômica tem desempenhado um papel fundamental na compreensão da complexidade e da interconexão dos sistemas biológicos em todo o mundo.

As análises metagenômicas têm como objetivo primordial investigar tanto a diversidade taxonômica quanto a funcionalidade do ambiente em estudo. Em outras palavras, elas buscam identificar quais micro-organismos estão presentes em um determinado ambiente e compreender suas atividades e funções dentro desse contexto específico. Ao fornecer uma visão abrangente da comunidade microbiana e de suas interações, essas análises são essenciais para elucidar os processos ecológicos e biológicos que moldam os ecossistemas naturais (THOMAS et al., 2015).

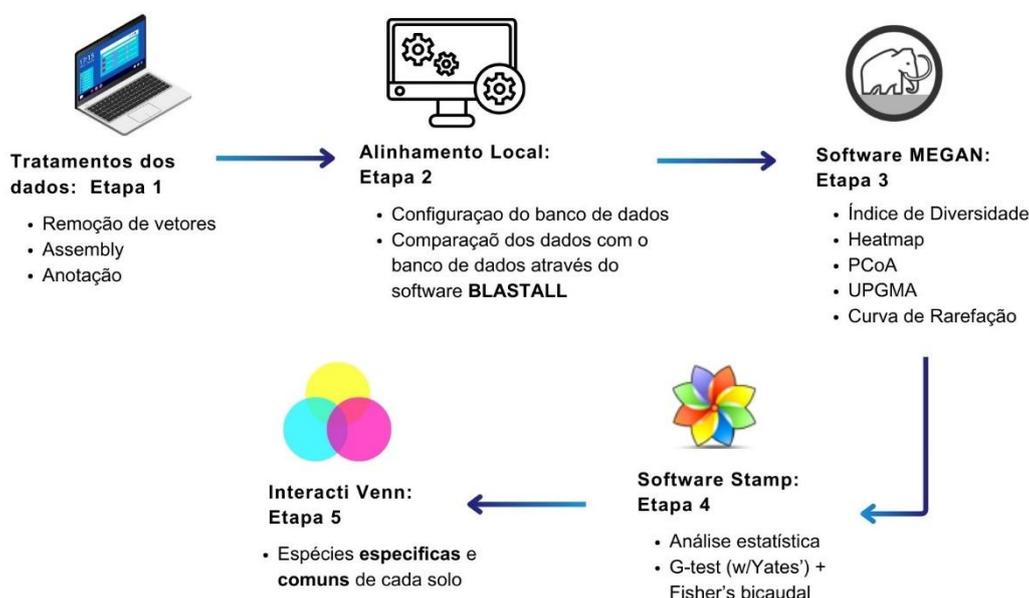
Métodos metagenômicos oferecem flexibilidade ao aplicar abordagens *marker gene* ou *shotgun*, conforme exigido pelo estudo em questão, na análise de dados *shotgun*, uma variedade de estratégias pode ser empregada, com a etapa inicial frequentemente consistindo na execução de ferramentas de controle de qualidade para identificar e eliminar sequências de qualidade inferior essa abordagem meticulosa assegura que apenas os dados de alta qualidade sejam utilizados, garantindo a precisão e a confiabilidade das análises subsequentes (BREITWIESER et al., 2019).

Shotgun o sequenciamento de todo o genoma (WGS) revolucionou a abordagem da metagenômica. Enquanto métodos anteriores se concentravam em genes individuais ou genomas isolados, o WGS oferece uma perspectiva panorâmica da comunidade microbiana. Essa técnica ampla e poderosa permite uma avaliação mais abrangente dos níveis de diversidade filogenética e polimorfismo intra espécie, proporcionando insights sem precedentes sobre a complexidade dos ecossistemas microbianos (CHEN et al., 2005).

4. METODOLOGIA

A **Figura 1**, a seguir, mostra um fluxograma detalhado da metodologia empregada neste estudo, cujas etapas serão explicadas ao longo do texto.

Figura 1. Fluxograma: Etapas gerais da metodologia. Os tratamentos de dados da etapa 1 foram realizados em um estudo anterior.



4.1 Amostragem do Solo

Foram coletadas amostras de cinco tipos de solo sob distintos tratamentos na Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO), situada em Dourados – MS. Os solos incluíam Mata Nativa, Pastagem Contínua, Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional.

A coleta foi feita até 10 cm de profundidade, com 10 amostras simples combinadas para formar uma amostra composta representativa de cada área. Essas amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis, refrigeradas e transportadas ao Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP de Jaboticabal (LMSEQ) para análise de sequenciamento genético.

4.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA, empregou-se o kit de isolamento de DNA da MOBIO LABORATORIES, seguindo as orientações do fabricante. A quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas por espectrofotometria UV-Vis NanoDrop, fluorometria Qubit e espectrofotometria UV-Vis Nanodrop. Os resultados da relação 260/280nm, obtidos no Nanodrop, foram os seguintes: Amostra 1 (Solo 1) - 126,10 ng/uL, 1,90 (260/280); Amostra 2 (Solo 2) - 103,90 ng/uL, 1,80 (260/280); Amostra 3 (Solo 3) - 100,50 ng/uL, 1,73 (260/280); Amostra 4 (Solo 4)- 51,0 ng/uL, 1,84 (260/280); Amostra 5 (Solo 5) - 28,5 ng/uL, 1,95 (260/280).

4.3 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento de DNA foi conduzido utilizando a tecnologia Illumina, por meio do sistema HiSeq 2500. A qualidade das sequências foi verificada pelo software FastQC e aquelas de baixa qualidade ou muito curtas (< 50 pares de bases) foram filtradas usando o programa Prinseq-lite (SCHMIEDER, 2011). A montagem das sequências foi realizada com o auxílio do programa IDBA-UD (PENG et al., 2012), enquanto a identificação das Open Reading Frames (ORFs) foi feita através do programa FragGeneScan (RHO et al., 2010). Este processo de sequenciamento seguiu as etapas previamente descritas em um estudo anterior (RISSI, 2015), que envolveu a amostragem de solos de diferentes tipos e a extração do DNA.

4.4 Formatação do Banco de Dados Local

Um banco de dados dedicado à enzima α -amilase (EC 3.2.1.2) foi desenvolvido utilizando o Identical Protein Groups disponível no site do NCBI. Este banco de dados abrange uma ampla gama de organismos, incluindo bactérias, archaeas e fungos, totalizando 75.456 sequências de proteínas. A estruturação desse banco de dados oferece uma base sólida para estudos e análises relacionados à função e diversidade dessa enzima em diferentes organismos.

4.5 Alinhamento Local

Utilizando o terminal do Linux, foi conduzido o BLAST para realizar uma análise de similaridade entre as cinco amostras de solos e o banco de dados local da enzima α -amilase previamente construído.

As linhas de comando utilizadas para executar o blastall foram as seguintes:

```
blastall -p blastp -i Solo1.faa -o Solo1.out -n 1 -b 1 -v 1 -e 1e-05 -  
d/home/mateus/bd/TCC/sequence.fasta
```

```
blastall -p blastp -i Solo2.faa -o Solo2.out -n 1 -b 1 -v 1 -e 1e-05 -  
d/home/mateus/bd/TCC/sequence.fasta
```

```
blastall -p blastp -i Solo3.faa -o Solo3.out -n 1 -b 1 -v 1 -e 1e-05 -  
d/home/mateus/bd/TCC/sequence.fasta
```

```
blastall -p blastp -i Solo4.faa -o Solo4.out -n 1 -b 1 -v 1 -e 1e-05 -  
d/home/mateus/bd/TCC/sequence.fasta
```

```
blastall -p blastp -i Solo5.faa -o Solo5.out -n 1 -b 1 -v 1 -e 1e-05 -  
d/home/mateus/bd/TCC/sequence.fasta
```

Essa análise permitiu avaliar a similaridade das sequências das proteínas presentes nas amostras de solos em relação às sequências da enzima α -amilase do banco de dados local, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada da diversidade e distribuição dessa enzima nos diferentes ambientes.

4.6 Análise de dissimilaridade genética

Os resultados do blastall foram importados para o MEGAN 6 para a criação de arquivos no formato RMA, visando à análise de dissimilaridade genética. O MEGAN foi empregado para comparar e classificar taxonomicamente as sequências da α -amilase em cada amostra de solo, além de realizar análises de índices de diversidade, Heatmap, Análise de co-ocorrência, PCoA, UPGMA e curva de rarefação.

4.7 Análise Estatística

Utilizando o programa STAMP versão 2.1.3, foram realizadas análises estatísticas para comparar par-a-par cada amostra de solo. Um gráfico de barra de erro estendido foi gerado, empregando o teste estatístico G-test (w / Yates') + Fisher's de dois lados, considerado o padrão-ouro para a metagenômica envolvendo duas amostras, com um intervalo de confiança de 95%. Apenas resultados com p-value < 0.05 foram considerados na geração dos gráficos de erro estendido.

4.8 Diagrama de Venn

A partir do software MEGAN, foi criado um arquivo .txt contendo a lista de espécies presentes em todas as amostras de solo. Utilizando a ferramenta de análise Interacti-Venn (HEBERIE, 2015), por meio de gráficos de Venn, foi possível examinar o perfil da microbiota em cada solo e identificar as espécies comuns a todas as amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Abundância

Foram identificadas 87.472 sequências pertencentes a enzima α -amilase distribuída nas cinco amostras de solos, como mostrada na **tabela 1**, além disso é possível observar a abundância de *ORFs* presentes nas amostras de solos. A amostra de solo que retornou maior representatividade da enzima foi a de Pastagem Contínua com um total de 25.205 sequências, enquanto a de Mata Nativa retornou a menor quantidade de sequência da enzima α -amilase entre os solos em um total de 9.480 sequência.

Tabela 1. Quantidade de sequências de DNA de microrganismos que produzem enzima α -amilase e *ORFs nas 5 amostras de solo.

Solos	α-Amilase	*ORFs
Mata Nativa	9.480	46.430
Pastagem Contínua	25.205	137.703
Plantio Direto	18.408	75.866
Integração Lavoura-Pecuária	22.983	128.475
Plantio Convencional	11.396	71.762

*ORFs (Open Reading Frame)

5.2 Índice de Diversidade

O índice de diversidade de Shannon-Weaver opera sob a suposição de que os indivíduos são aleatoriamente amostrados de uma grande população independente (SOUZA, et al., 2023). No índice de diversidade quanto maior o valor gerado pela análise de Shannon-Weaver maior será a diversidade e em contrapartida, valores mais baixos correspondem a uma diversidade reduzida.

Na **tabela 2** a amostra de Plantio Direto indica ter uma maior diversidade de microrganismos produtoras da enzima α -amilase. De acordo com CASTOLDI (2012), no manejo sob sistema de plantio direto, a adubação das plantas que compõem o sistema deve ser realizada com o objetivo de minimizar a perda de nutrientes e promover a sincronização entre a decomposição e a liberação dos nutrientes da cultura anterior com o crescimento da cultura seguinte, favorecendo assim a vida e a diversidade microbiana. Em seguida, o solo Integração Lavoura Pecuária apresentou um índice de diversidade de 5,735. Assim indicando que teve uma maior diversidade em relação aos solos de Pastagem Contínua, Plantio Convencional e Mata Nativa, que respectivamente apresentaram índices de diversidade de 5,558, 5,412 e 5,296.

Tabela 2. Índices de Diversidade de Shannon-Weaver das cinco amostras de solo obtidas no software MEGAN.

Solos	Índice de Diversidade
	Shannon-Weaver
Plantio Direto	5,778
Integração Lavoura Pecuária	5,735
Pastagem Contínua	5,558
Plantio Convencional	5,412
Mata Nativa	5,296

5.3 Heatmap

A análise de *heatmap* tem objetivo de mostrar a comparação entre a abundância relativa de dados com as amostras de solos analisadas. A **figura 2 e 3** mostram a comparação de abundância a nível de filo e espécie respectivamente, encontrados nos cinco solos, na análise de *heatmap* as cores indicam a ocorrência dos organismos, a cor vermelha indica a maior ocorrência e azul a menor ocorrência. É possível verificar que na **Figura 2** na análise a nível de filo o solo 3 que correspondente ao manejo de Plantio Direto foi o que apresentou a maior abundância de microrganismos produtores da enzima α -amilase, já na **figura 3** na análise a nível de espécie o solo 1 que corresponde ao solo de Mata Nativa foi o que apresentou a maior abundância em comparação aos demais solos.

No solo 3 (Plantio Direto) os filios que apresentaram a maior ocorrência foram *Candidatus Rokubacteria*, *Candidatus Tectomicrobia*, *Plantomycetes*, *Actinobacteria*. O filo *Candidatus Rokubacteria* desempenha um papel fundamental na reciclagem de nitrogênio (N) e enxofre (S) e é metabolicamente versátil (BUTTERFIELD et al., 2016). Além disso, a expressão de suas álcool desidrogenases PQQ foi observada no solo, indicando que essas enzimas podem ser funcionais nessas bactérias específicas. A *Candidatus tectomicrobia* são encontradas em diversos ambientes como solos, sedimentos marinhos e águas subterrâneas, a tectomicrobia também está envolvida em processos metabólicos importantes, como a degradação de compostos orgânicos

e a produção de metabólicos secundários (CASTELLE et al., 2018). Um filo considerado distinto do domínio bactéria os *Plantomycetes* são encontrados comumente em solos, rios de água doce e em sedimentos abissais oceânicos e possuem algumas características incomuns como falta de peptidoglicano em suas paredes celulares e compartimentalização intracelular (FUERST et al., 2011). Os actinobactérias são filas com os grupos mais diversos de microrganismos da natureza e são conhecidos por sua versatilidade metabólica incomparável, e estão distribuídos amplamente nos ecossistemas terrestres e aquáticos (VAN BERGEIJK et al., 2020).

Com as análises de *heatmap* a nível de filo os dados obtidos confirmaram a diversidade microbiana presente no solo. Segundo Waldrop (2003) as práticas de manejo de solo podem afetar significativamente as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, assim afetando a maior diversidade ou não de microrganismo no mesmo. Solos cultivados com manejos de Pastagem Contínua, Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional pode ocorrer a alteração da microbiota do solo com organismos que se adaptam aos manejos.

Na **figura 3**, onde observamos a análise *heatmap* a nível de espécie, podemos verificar que o solo 1 de Mata Nativa foi o que retornou maior ocorrência de espécies comparados aos manejos de solo. Considerando que a amostra da Mata Nativa é minimamente impactada pela intervenção humana, a seleção natural das bactérias nesse ambiente ocorre de forma natural e abundante.

A análise *heatmap*, tanto a nível de filo quanto de espécies, evidencia que os distintos manejos exerceram influência na microbiota de cada amostra de solo. Como mencionado anteriormente, o solo da Mata Nativa se destaca pela maior diversidade de espécies e por um volume mais expressivo.

Figura 2. Análise de abundância heatmap gerado pelo programa MEGAN a nível de filo. Solo 1: Mata Nativa; Solo 2: Pastagem Contínua; Solo 3: Plantio Direto; Solo 4: Integração Lavoura Pecuária; Solo 5: Plantio Convencional.

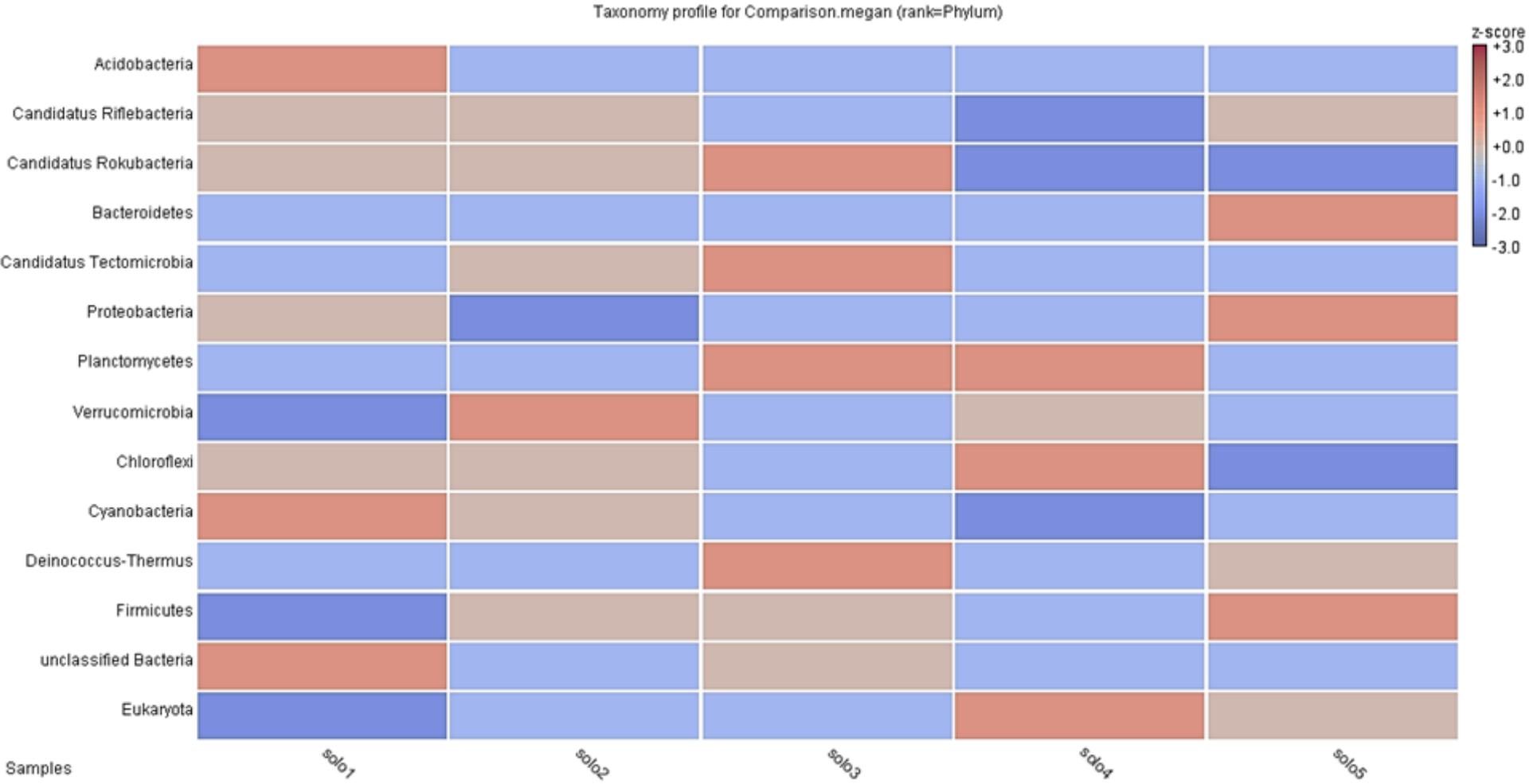
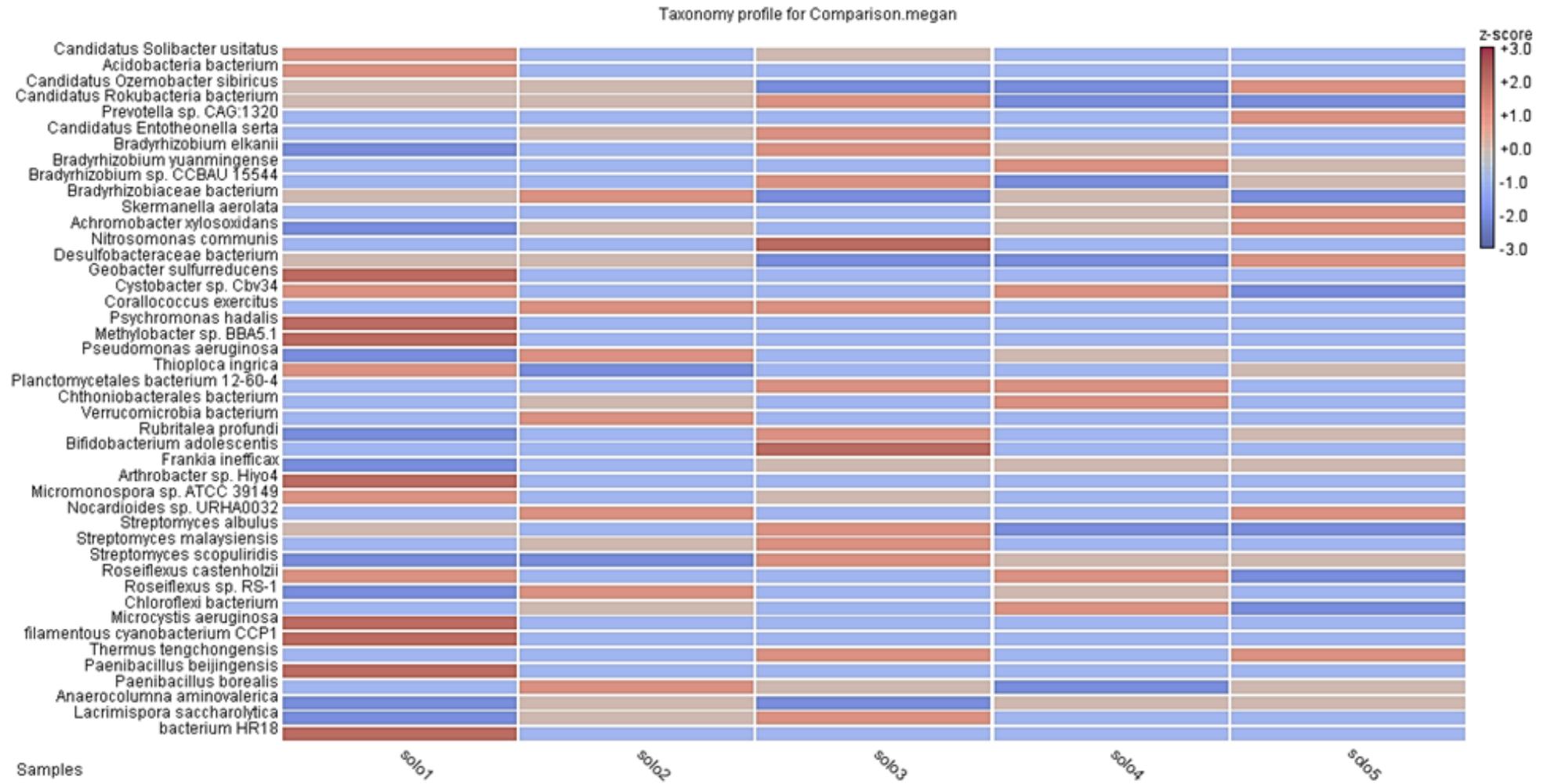


Figura 3. Análise de abundância heatmap gerado pelo programa MEGAN a nível de espécies. Solo 1: Mata Nativa; Solo 2: Pastagem Contínua; Solo 3: Plantio Direto; Solo 4: Integração Lavoura Pecuária; Solo 5: Plantio Convencional.



5.4 PCoA

Na **figura 4** está apresentado os resultados da análise de coordenadas principais (PCoA), nesta análise ocorre o mapeamento das amostras em diferentes dimensões e reflete a similaridade das comunidades biológicas. A dissimilaridade entre os dados das amostras de solos aumenta conforme a distância entre os pontos se torna maior. Com base nas informações filogenéticas é feito um cálculo para avaliar a distância entre as amostras.

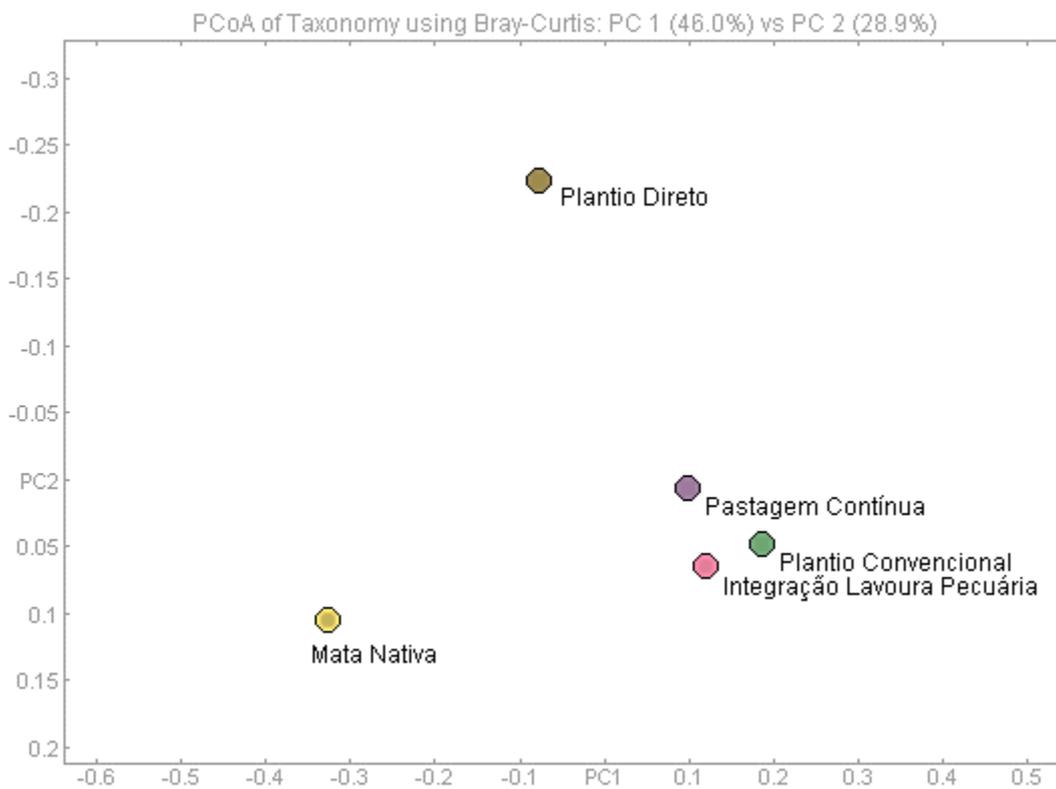
Com base nos resultados da **figura 4** as amostras de solos de Plantio Direto (solo 3) e Mata Nativa (solo 1) estão afastados dos demais manejos de solos. A distância observada na análise de PCoA no solo de Mata Nativa (solo 1) é explicada por que se trata de um ambiente que sofreu pouca interferência de ação humana assim permitindo o crescimento de microrganismos naturalmente no solo.

Já o manejo de Plantio Direto (Solo 3) é definido pela cobertura contínua do solo ao longo do ano, com revolvimento restrito à linha de semeadura. Tratamentos que incorporam a rotação de culturas no plantio direto exibiram uma atividade microbiana significativamente mais elevada em comparação com os tratamentos de monocultura no plantio convencional (DIAS et al., 2018).

Enquanto os mais próximos são os de Pastagem Contínua (solo 2), Integração Lavoura Pecuária (solo 4) e Plantio Convencional (solo 5). integração lavoura-pecuária e Pastagem Contínua, são sistemas de produção agropecuária que incorporam o uso de pastagens para alimentação animal (Souza et al., 2018). O sistema de integração lavoura-pecuária provoca variações nas intensidades de pastos e mudanças na diversidade funcional da microbiota e na atividade microbiana, apresentando-se como indicadores potenciais da qualidade do solo (CHÁVEZ et al., 2011). A diversidade genética da comunidade bacteriana total do solo foi menor sob o manejo de Plantio Convencional em comparação com o manejo de Plantio Direto (PEREIRA et al., 2007).

A análise de Coordenadas Principais (PCoA) válida os resultados obtidos pela análise UPGMA.

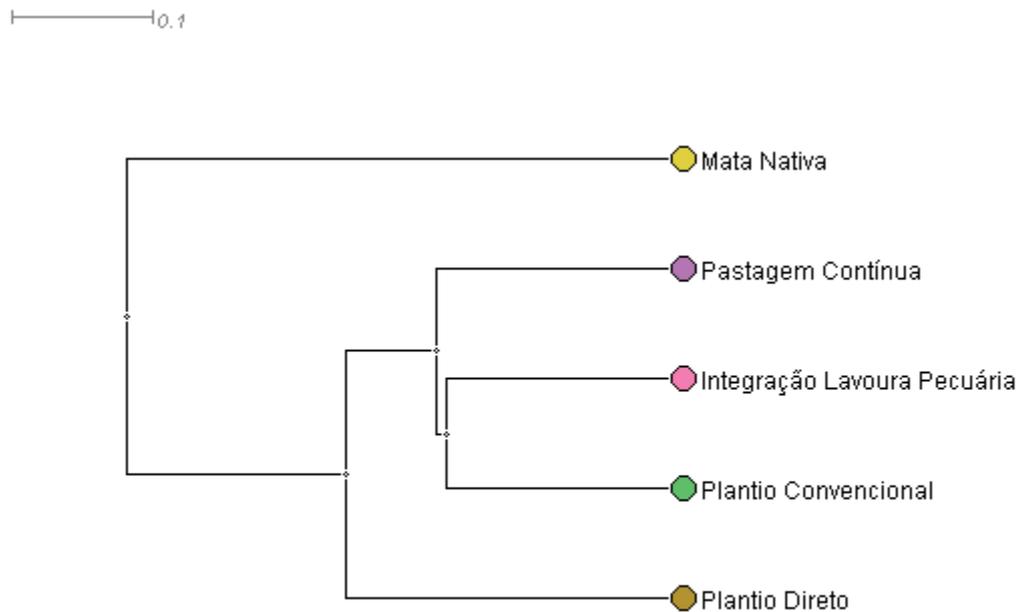
Figura 4. Análise do mapeamento das amostras em diferentes dimensões e similaridade das comunidades biológicas (PCoA) gerada pelo programa MEGAN, calculada através do método de distâncias Bray Curtis.



5.5 UPGMA

Na análise de cluster do tipo UPGMA realizada pelo programa MEGAN, uma maior ramificação indica menor similaridade entre as amostras de solos. Destaca-se que, na análise, a amostra de solo da Mata Nativa se destaca ao se isolar das demais amostras. Essa singularidade é atribuída às características naturais do solo, indicando uma presença limitada de interferência antrópica. O solo da Mata Nativa, por suas características específicas e organismos naturais ao ambiente, evidencia-se como um ecossistema com uma marcante distinção em relação às demais amostras analisadas.

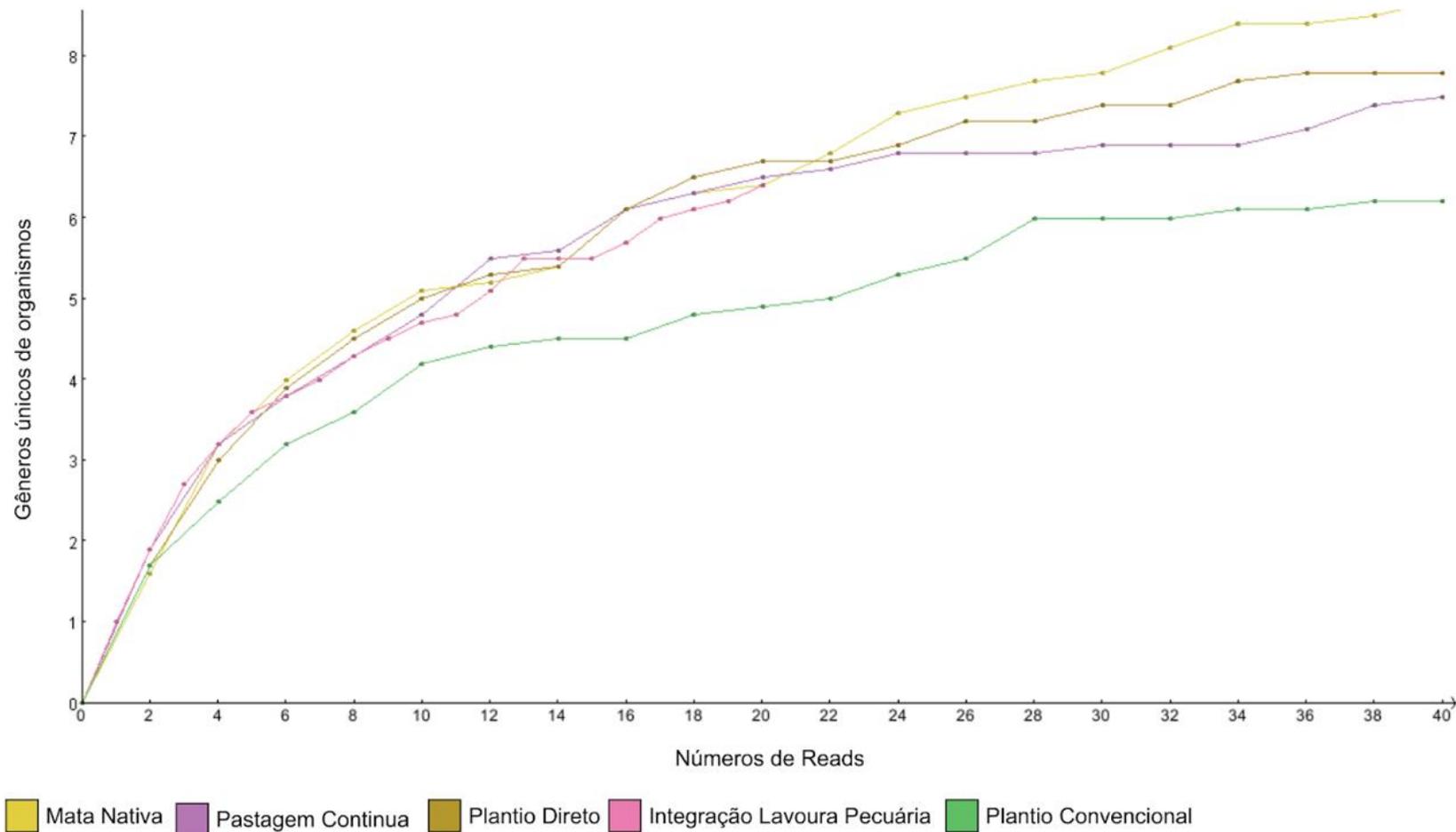
Figura 5. Análise de cluster (UPGMA) gerada pelo programa MEGAN onde uma maior ramificação indica menor similaridade entre as amostras de solos.



5.6 Curva de Rarefação

A análise da **figura 6** revela-se a curva de rarefação, destacando a avaliação da diversidade taxonômica em relação aos filós nas cinco amostras de solos. A curva demonstra que as amostras atingiram um platô, indicando que o aumento na quantidade de DNA sequenciado não resultaria em acréscimo na riqueza de espécies produtoras da enzima α -amilase. Esse platô indica que o DNA sequenciado já é adequado para representar toda a diversidade de microrganismos com o gene estudado. Notavelmente, a análise da curva de rarefação revela que a amostra da Mata Nativa apresenta uma maior diversidade taxonômica de produtores da enzima α -amilase em comparação com a amostra do Plantio Convencional, atribuindo-se essa diferença à ausência de intervenções antrópicas no solo da Mata Nativa. Essa curva foi construída com base nas α -amilase identificadas nas cinco amostras de solos analisadas.

Figura 6. Curva de rarefação da avaliação da diversidade taxonômica em relação aos filós nas cinco amostras de solos em relação às sequências de α -amilase. Geradas pelo programa MEGAN nas cinco amostras de solo.



5.7 Interacti-Venn

Utilizando a ferramenta Interacti-Venn, é possível visualizar, por meio de diagramas de Venn, os microrganismos compartilhados entre os cinco solos analisados, bem como identificar aqueles exclusivos de cada amostra, abrangendo solo da Mata Nativa, Pastagem Contínua, Plantio Direto, Integração Lavoura-Pecuária e Plantio Convencional.

Na **figura 7**, é apresentado o diagrama de Venn que ilustra os resultados a nível de espécie. Na **tabela 3** destaca quais são os microrganismos comuns a todas as amostras e os exclusivos de cada uma. 19 espécies foram comuns entre os cinco manejos de solos. As amostras de solo apresentaram microrganismos exclusivos em diferentes quantidades: a Mata Nativa revelou 7 microrganismos exclusivos, a Pastagem Contínua contou com 9, o Plantio Direto identificou 13, a Integração Lavoura Pecuária mostrou 15, e o Plantio Convencional apresentou apenas 1 microrganismo exclusivo.

Figura 7. Diagrama de Venn de interação das espécies de microrganismos produtores da enzima α -amilase comuns a todas as amostras e exclusivos de cada amostra. Solo 1: Mata Nativa; Solo 2: Pastagem Contínua; Solo 3: Plantio Direto; Solo 4: Integração Lavoura Pecuária; Solo 5: Plantio Convencional

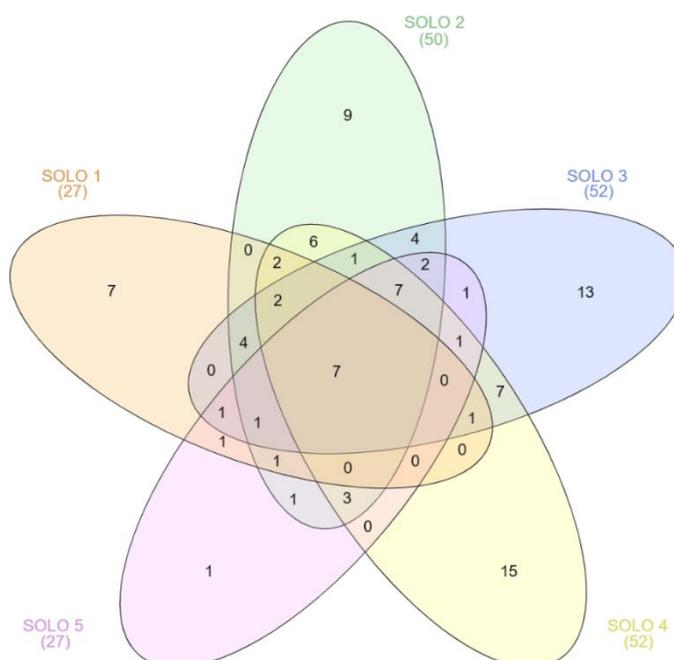


Tabela 3. Lista de espécies produtoras de α -amilase comum a todas as amostras de solo e das espécies candidatas presentes exclusivamente em cada amostra de solo

Amostras	Espécies
Espécies comuns em todos os solos	" <i>Acidobacteria bacterium</i> " " <i>Candidatus Ozemobacter sibiricus</i> " " <i>Pseudomonas aeruginosa</i> " " <i>Thioploca ingrlica</i> " " <i>Verrucomicrobia bacterium</i> " " <i>Roseiflexus sp.</i> " " <i>Anaerocolumna aminovalerica</i> "
Mata Nativa (Solo 1)	" <i>Geobacter sulfurreducens</i> " " <i>Psychromonas hadalis</i> " " <i>Methylobacter sp.</i> " " <i>Microcystis aeruginosa</i> " " <i>filamentous cyanobacterium</i> " " <i>Paenibacillus beijingensis</i> " " <i>bacterium HR18</i> "
Pastagem Contínua (Solo 2)	" <i>Candidatus Sumerlaea chitinivorans</i> " " <i>Comamonadaceae bacterium</i> " " <i>Planctomycetes bacterium HGW-Planctomycetes-1</i> " " <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> " " <i>Dietzia cinnamea</i> " " <i>Microbacterium aurum</i> " " <i>Salinibacterium sp.</i> " " <i>Oceanithermus profundus</i> " " <i>Ignisphaera aggregans</i> "
Plantio Direto (Solo 3)	" <i>Comamonadaceae bacterium</i> " " <i>Nitrosomonas communis</i> " " <i>delta proteobacterium</i> " " <i>Methylomicrobium lacus</i> " " <i>Halomonas sp.</i> " " <i>Pseudomonas sp.</i> " " <i>Planctomycetes bacterium</i> " " <i>Bifidobacterium adolescentis</i> " " <i>Bifidobacterium angulatum</i> " " <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> " " <i>Actinoplanes sp.</i> " " <i>Streptomyces laurentii</i> " " <i>Rhizoctonia solani</i> "

Integração Lavoura Pecuária (Solo 4)	<i>"candidate division KSB1 bacterium"</i> <i>"Dysgonomonas mossii"</i> <i>"Bacteroidetes bacterium"</i> <i>"Novosphingobium capsulatum"</i> <i>"Ralstonia pickettii"</i> <i>"Cystobacter sp."</i> <i>"Alteromonas sp."</i> <i>"Chromohalobacter canadensis"</i> <i>"Corynebacterium ulcerans"</i> <i>"Streptomyces albidoflavus"</i> <i>"Streptomyces hundungensis"</i> <i>"Streptomyces sp."</i> <i>"Alicyclobacillus sp."</i> <i>"Paenibacillus sonchi"</i> <i>"Petrotoga mobilis"</i>
Plantio Convencional (Solo 5)	<i>"Elusimicrobia bacterium"</i>

Os seguintes microrganismos ocorreram simultaneamente em todas as amostras de solo. *Acidobacteria bacterium* representa bactérias do solo sub-representado, cujos membros são difundidos e copiosamente distribuídos por quase todos os ecossistemas, as sequências de *Acidobacteria* são abundantes nos solos e representam uma fração significativa da comunidade microbiana do solo (Kalam et al 2020). *Candidatus Ozemobacter sibiricus* é comumente encontrada em comunidades microbianas de reservatórios subterrâneo profundo de águas termais (Кадников et al 2020). *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa e tem capacidade de formar biofilmes resistentes a antibióticos e são conhecidas por ser um patógeno humano oportunista que provoca infecções agudas e crônicas graves em pessoas com o sistema imunológico comprometido. (THI et al., 2020). *Thioploca ingrica* ocorre em sedimentos salobras a de água doce (MCKAY et al., 2023). *Verrucomicrobia bacterium* é uma espécie pertencente ao filo Verrucomicrobia que é conhecido por ser amplo e diversificado e que compreende principalmente espécies não cultivadas com genótipos desconhecidos (DUNFIELD et al., 2007). *Roseiflexus sp* encontrados em fonte termal siliciosa alcalina (VAN DER MEER et al., 2010). *Anaerocolumna aminovalerica* é levemente alcalifílica e são responsáveis pela fermentação de vários carboidratos, incluindo xilana e produziram acetato, etanol e H₂ (UEKI et al., 2016).

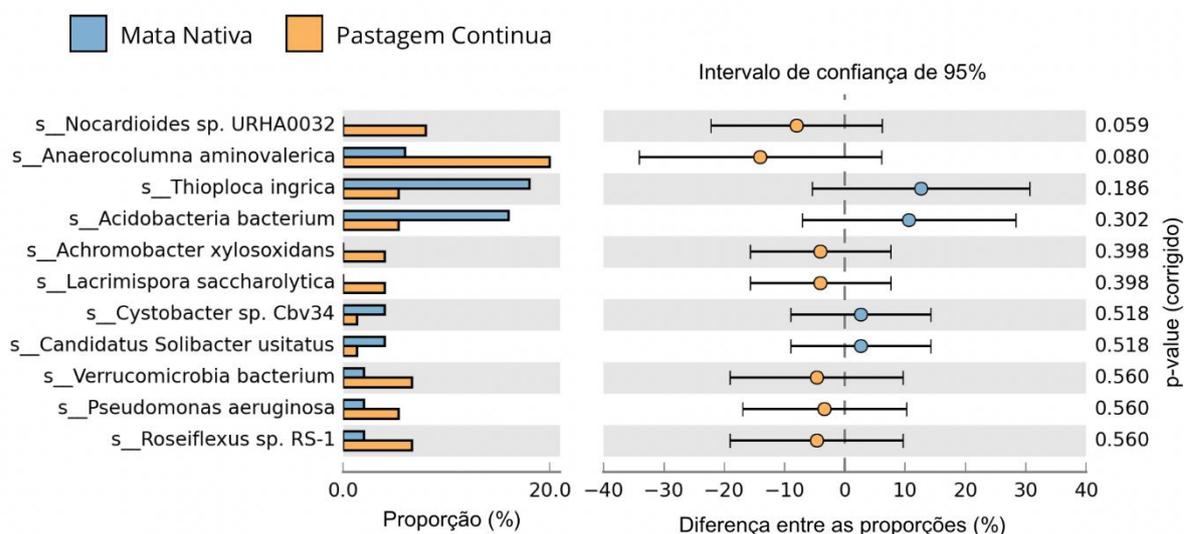
Os seguintes microrganismos foram exclusivos do solo da Mata Nativa (Solo 1). *Geobacter sulfurreducens*, são espécies redutoras de Fe (III) e são consideradas incapazes de fixar o dióxido de carbono (Zhang et al., 2020). *Psychromonas hadalis*, espécie bacteriana com necessidade obrigatória de pressão, denominada piezófila, foi identificada em amostras de sedimentos provenientes das profundezas da Fossa do Japão, coletadas a 7542 metros de profundidade (NOGI et al., 2007). *Methylobacter sp* são espécies de microrganismos que foram observados em aglomerados mistos e em células individuais, sugerindo que sua interação não está condicionada ao contato físico entre as células (VAN GRINSVEN et al., 2021). *Microcystis aeruginosa*, uma cianobactéria encontrada em ambientes de água doce, é uma espécie frequentemente associada a florações (YANG et al., 2018). *Filamentous cyanobacterium* compõem um conjunto diversificado e morfologicamente complexo de microrganismos procariontes (KOMÁREK et al., 2015). *Paenibacillus beijingensis* é uma bactéria Gram-positiva que foi o primeiro exemplo de um polímero semelhante a reuterano sintetizando 4,6- α -glucanotransferase (Gangoiti et al., 2017).

Os seguintes microrganismos foram exclusivos do solo de Pastagem Continua (Solo 2). *Candidatus Sumerlaea chitinivorans* é uma nova espécie de bactéria classificadas após análises filogenéticas e genômicas, pertencente ao filo candidato Sumerlaeota (Kadnikov et al, 2019). *Comamonadaceae bacterium* uma bactérias de água doce, pertencente a família Comamonadaceae, que é amplamente encontrada em habitats de água doce (Moon et al, 2018). A espécie de *Planctomycetes bacterium* podem ser encontrados em uma variedade de ambientes, como oceanos, sedimentos marinhos, lagos de água doce, águas residuais e solos terrestres (Fuerst et al., 2011). *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, que é uma espécie de bifidobactéria comum encontrada nas fezes de adultos (Saito et al., 2020). *Dietzia cinnamea* pertence à ordem de bactérias conhecida como Actinomycetales (Brown et al., 2022). *Microbacterium aurum* bactéria pertencente ao gênero Microbacterium, e são espécies gram-positivas e são comuns em ambientes aquáticos e no solo (Lee et al., 2023). A espécie *Salinibacterium* tem a capacidade de sobreviver em ambientes com altas concentração de sal (Lu et al., 2023).

5.8 Análise Estatística

Na análise estatística representada na **figura 8**, a primeira comparação destaca a divergência entre as amostras de solo da Mata Nativa e do manejo de Pastagem Contínua. Observa-se uma significativa disparidade na presença de microrganismos, onde as espécies *Thioploca ingrlica*, *Acidobacteria bacterium*, *Cystobacter sp* e *Candidatus Solibacter usitatus* predominam no solo da Mata Nativa, enquanto *Nocardioides sp*, *Anaerocolumna aminovalerica*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Lacrimispora saccharolytica*, *Verrucomicrobia bacterium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Roseiflexus sp* são mais prevalentes no solo do manejo de Pastagem Contínua. A espécie de bactéria que apresentou maior ocorrência foi *Anaerocolumna aminovalerica*, uma bactéria anaeróbica que pode usar o hidrogênio como doador de elétrons, responsável pela função redutora de urânio (TANG et al., 2021).

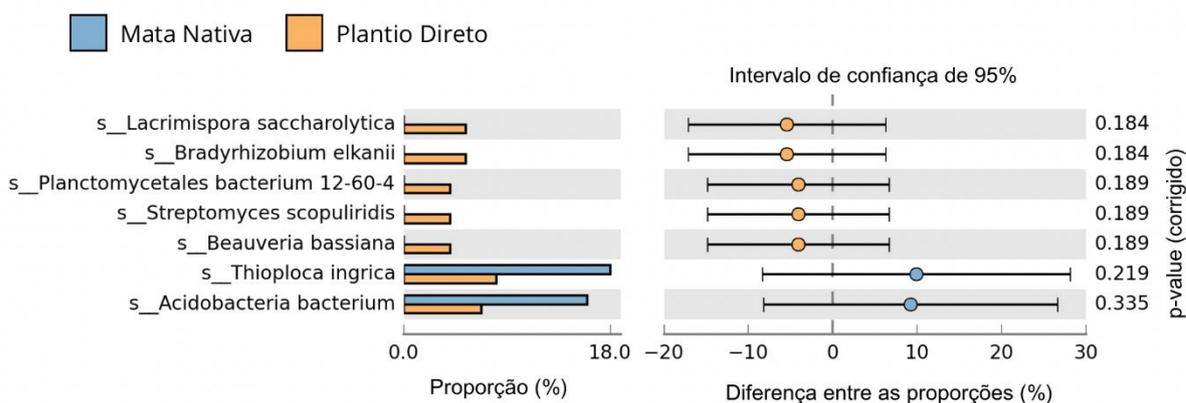
Figura 8. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Mata Nativa e Pastagem Contínua.



Na análise comparativa apresentada na **figura 9**, examinamos as amostras de solo de Mata Nativa e do Plantio Direto. Destaca-se que os microrganismos das espécies *Thioploca ingrlica* e *Acidobacteria* mantêm uma maior ocorrência no solo da

Mata Nativa, consistente com a comparação anterior devido à mesma amostra. Por outro lado, as espécies *Lacrimispora saccharolytica*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Planctomycetales bacterium*, *Streptomyces scopuliridis* e *Beauveria bassiana* demonstraram uma prevalência superior no solo do Plantio Direto, destacando a ausência dessas espécies no solo de Mata Nativa. A espécie que se destaca é a *Thioplaca ingrlica* descoberta em locais próximos às fozes de rios, habitando sedimentos bioturbados que exibem manchas sulfídricas de forma exclusiva (HØGSLUND et al., 2010).

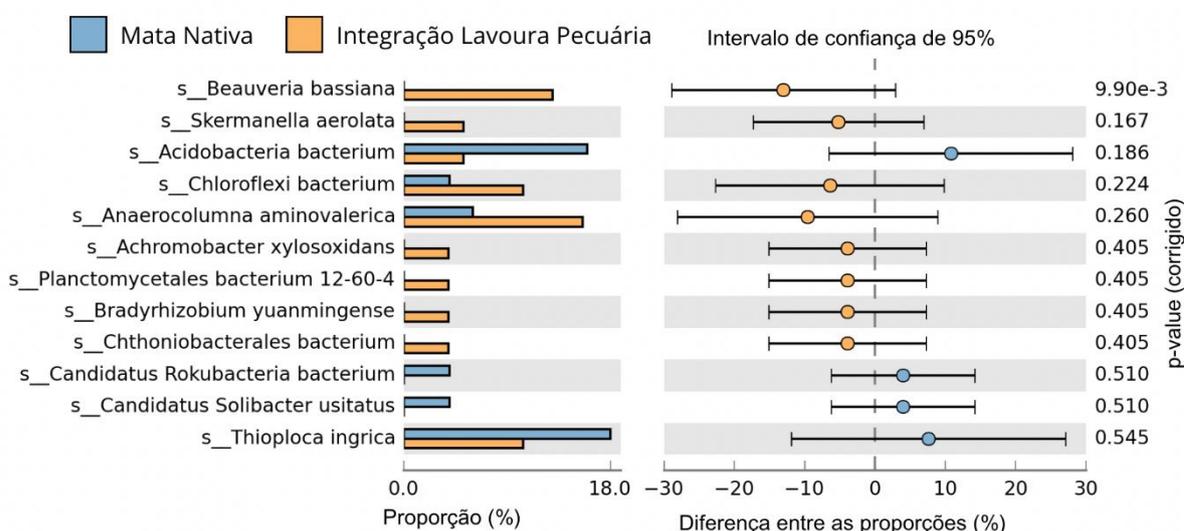
Figura 9. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Mata Nativa e Plantio Direto.



Na análise representada na **figura 10**, exploramos a comparação entre as amostras de solo de Mata Nativa e Integração Lavoura Pecuária. Observa-se que os microrganismos das espécies *Thioplaca ingrlica* e *Acidobacteria* mantêm uma maior ocorrência no solo da Mata Nativa, em concordância com a comparação anterior devido à mesma amostra, entanto observamos que as espécies *Candidatus Rokubacteria bacterium* e *Candidatus Solibacter usitatus* também aparecem na amostra de Mata Nativa. Em contrapartida, as espécies *Beauveria bassiana*, *Skermanella aerolata*, *Chloroflexi bacterium*, *Anaerocolumna aminovalerica*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Planctomycetales bacterium*, *Bradyrhizobium*

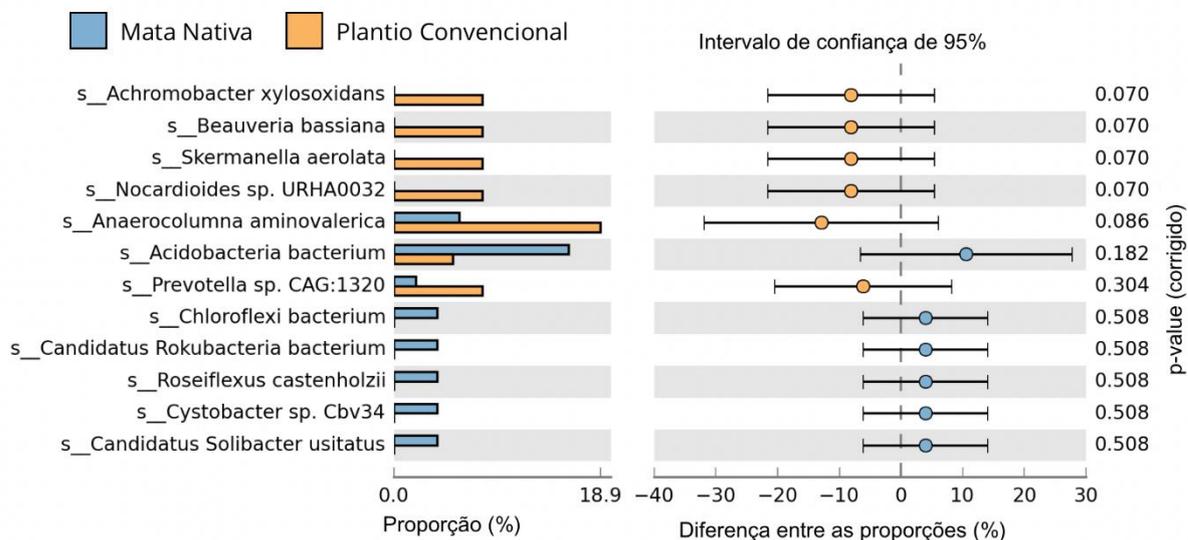
yuanmingense e *Chthoniobacterales bacterium* apresentam uma prevalência superior no solo da Integração Lavoura Pecuária. Destacasse a espécie *Acidobacteria* que são encontradas em diversos ecossistemas ao redor do globo e exibem uma notável abundância e diversidade, destacando-se especialmente nos solos (SIKORSKI et al., 2022).

Figura 10. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Mata Nativa e Integração Lavoura Pecuária.



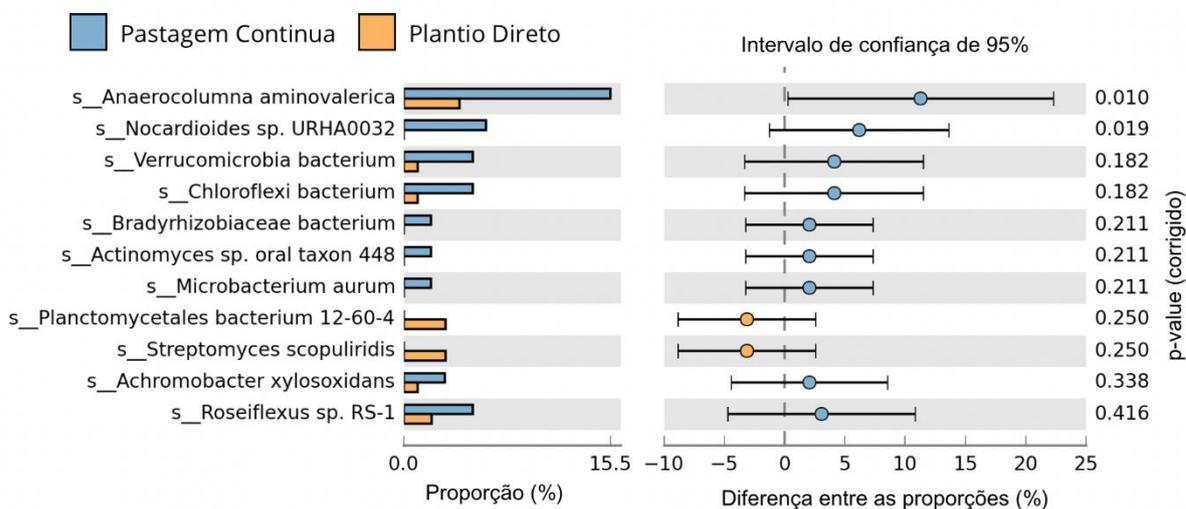
Na **Figura 11**, observa-se a comparação entre a amostra da Mata Nativa e o Plantio Convencional, evidenciando que os microrganismos das espécies *Acidobacteria bacterium*, *Chloroflexi bacterium*, *Candidatus Rokubacteria bacterium*, *Roseiflexus castenholzii*, *Cystobacter sp* e *Candidatus Solibacter usitatus* apresentam maior ocorrência no solo da Mata Nativa, reafirmando a constatação anterior de comparação com a mesma amostra. Por outro lado, as espécies *Achromobacter xylooxidans*, *Beauveria bassiana*, *Skermanella aerolata*, *Nocardiodides sp*, *Anaerocolumna aminovalerica* e *Prevotella sp* demonstraram maior presença na amostra de solo do Plantio Convencional, revelando uma elevada presença dessas espécies no solo.

Figura 11. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Mata Nativa e Plantio Convencional.



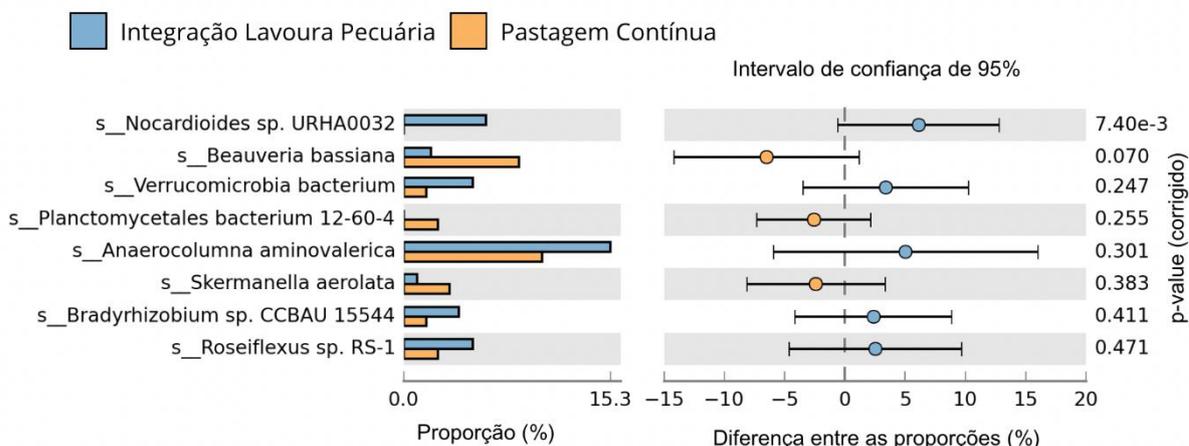
Na **figura 12** observamos a comparação entre a amostra da Pastagem Contínua e Plantio Direto é possível notar que o microrganismo das espécies *Anaerocolumna aminovalerica*, *Nocardioides sp*, *Verrucomicrobia bacterium*, *Chloroflexi bacterium*, *Bradyrhizobiaceae bacterium*, *Actinomyces sp*, *Microbacterium aurum*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Roseiflexus sp* tiveram maior ocorrência no solo da Pastagem Contínua. E as espécies *Planctomycetales bacterium* e *Streptomyces scopuliridis* tiveram maior ocorrência na amostra de solo do Plantio Direto.

Figura 12. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Pastagem Contínua e Plantio Direto.



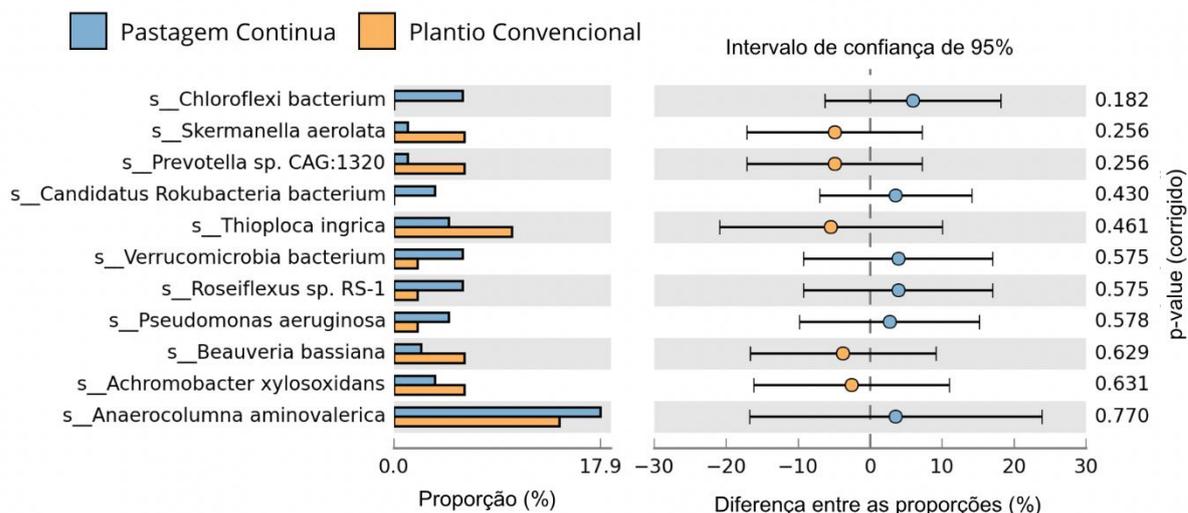
Na análise representada pela **figura 13**, destaca-se a comparação entre as amostras de Solo de Integração Lavoura Pecuária e Pastagem Contínua. É possível notar que os microrganismos da espécie *Nocardioides sp*, *Verrucomicrobia bacterium*, *Anaerocolumna aminovalerica*, *Bradyrhizobium sp* e *Roseiflexus sp* tiveram maior ocorrência no solo da Integração Lavoura Pecuária. Já as espécies *Beauveria bassiana*, *Planctomycetales bacterium* e *Skermanella aerolata* tiveram a maior ocorrência na amostra de solo da Pastagem Contínua.

Figura 13. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Integração Lavoura Pecuária e Pastagem Contínua.



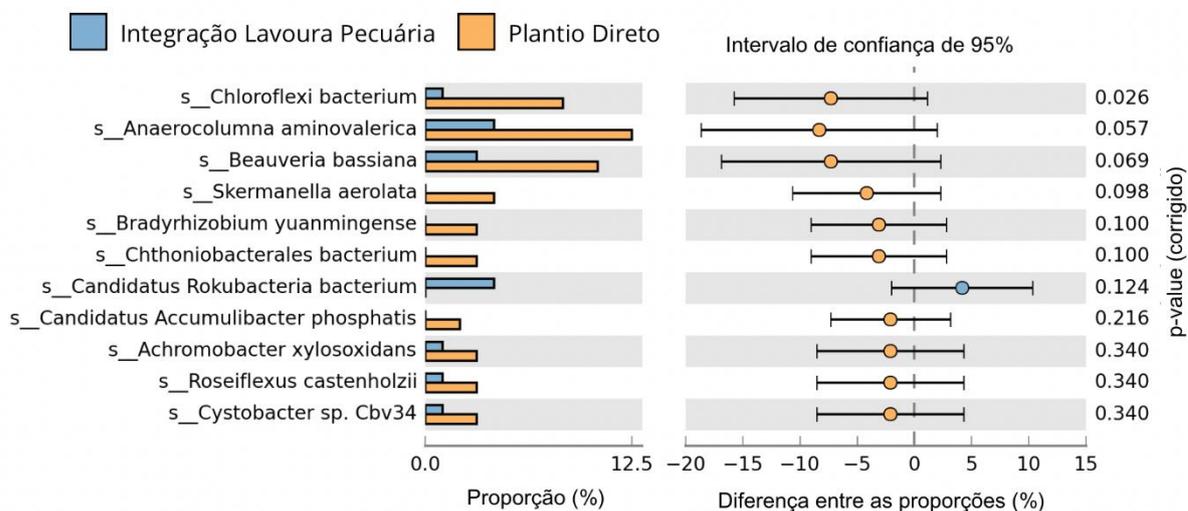
Ao analisar a **figura 14**, destaca-se a análise comparativa entre as amostras de Pastagem Contínua e Plantio Convencional. Observa-se que os microrganismos pertencentes às espécies *Chloroflexi bacterium*, *Candidatus Rokubacteria bacterium*, *Verrucomicrobia bacterium*, *Roseiflexus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Anaerocolumna aminovalerica* apresentaram uma ocorrência mais proeminente no solo da Pastagem Agroecológica, enquanto as espécies *Skermanella aerolata*, *Prevotella sp*, *Thioploca ingrica*, *Beauveria bassiana* e *Achromobacter xylosoxidans* demonstraram maior prevalência na amostra de solo do Plantio Convencional.

Figura 14. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Pastagem Contínua e Plantio Convencional.



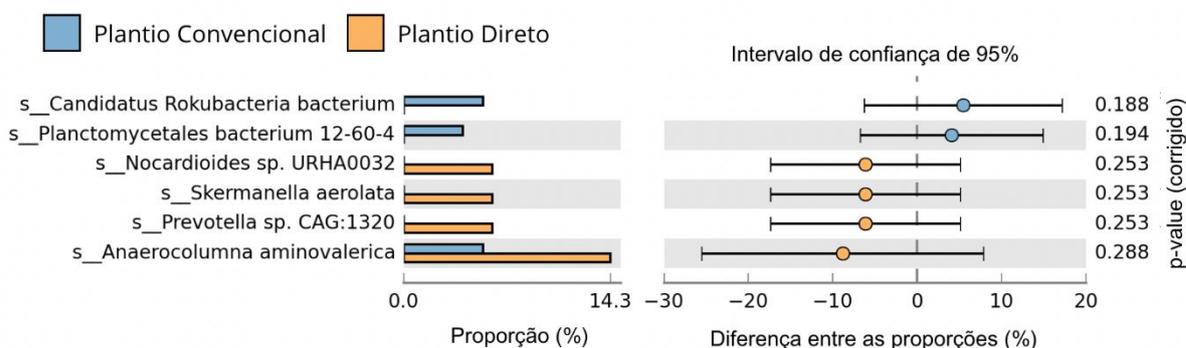
Ao examinar a **figura 15**, evidencia-se a análise comparativa entre as amostras de Integração Lavoura Pecuária e Plantio Direto. Observa-se que o microrganismo pertencente à espécie *Candidatus Rokubacteria bacterium* apresentou uma ocorrência mais proeminente no solo do Integração Lavoura Pecuária, enquanto as espécies *Chloroflexi bacterium*, *Anaerocolumna aminovalerica*, *Beauveria bassiana*, *Skermanella aerolata*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Chthoniobacterales bacterium*, *Candidatus Accumilibacter phosphatis*, *Achromobacter xylooxidans*, *Roseiflexus castenholzii* e *Cystobacter sp* demonstraram maior prevalência na amostra de solo de Plantio Direto. É relevante notar que o solo de Plantio Direto exibiu uma presença substancial de espécies em comparação ao solo de Integração Lavoura Pecuária.

Figura 15. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Integração Lavoura Pecuária e Plantio Direto.



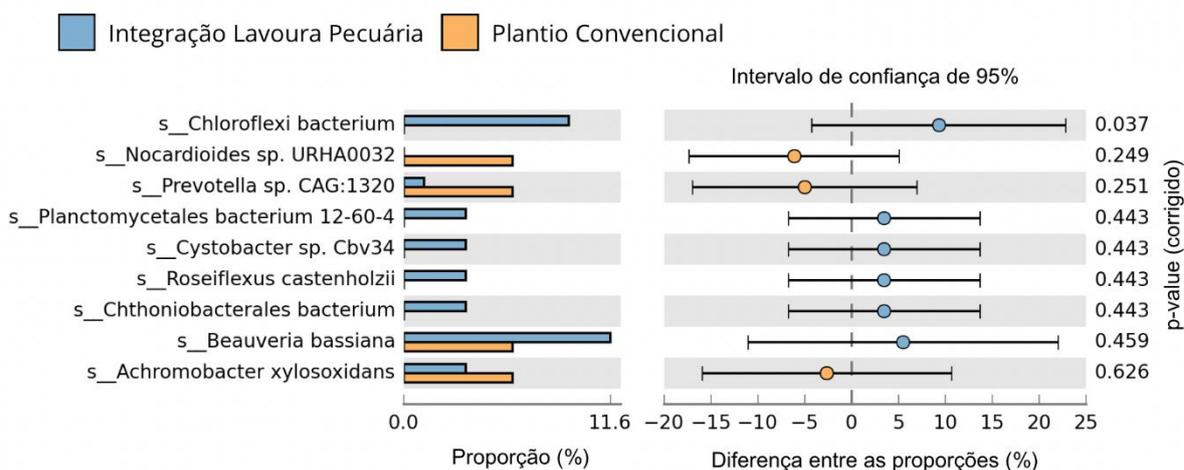
Na **figura 16** se encontra a comparação entre a amostra da Plantio Convencional e Plantio Direto é possível notar que os microrganismos das espécies *Candidatus Rokubacteria bacterium* e *Planctomycetales bacterium* tiveram maior ocorrência no solo do Plantio Convencional. E as espécies *Nocardioides sp*, *Skermanella aerolata*, *Prevotella sp* e *Anaerocolumna aminovalerica* tiveram maior ocorrência no manejo de Plantio Direto.

Figura 16. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Plantio Convencional e Plantio Direto.



Ao analisar a **figura 17**, destaca-se a comparação entre as amostras de Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional. Observa-se que os microrganismos pertencentes às espécies *Chloroflexi bacterium*, *Planctomycetales bacterium*, *Cystobacter sp*, *Roseiflexus castenholzii*, *Chthoniobacterales bacterium* e *Beauveria bassiana* apresentaram maior ocorrência no solo de Integração Lavoura Pecuária. Já as espécies *Nocardioides sp*, *Prevotella sp* e *Beauveria bassiana* apresentaram maior ocorrência no manejo de Plantio Convencional. É relevante notar que o solo de Integração Lavoura Pecuária exibiu uma presença substancial de espécies. a espécie *Beauveria bassiana* se destaca essa análise estatística essa espécie de bactéria desempenha uma função essencial no controle de uma vasta gama de artrópodes prejudiciais em ambientes agrícolas, veterinários e florestais (MASCARIN et al., 2016).

Figura 17. Análise estatística (Stamp) do intervalo de confiança comparando os solos da Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional.



As análises das cinco amostras de solo revelaram que as espécies mais prevalentes incluem *Acidobacteria bacterium*, *Thioploca ingrlica*, *Anaerocolumna aminovalerica* e *Roseiflexus sp.* Essas espécies mostraram-se consistentes em todas as amostras, conforme indicado pelo diagrama de Venn gerado pela ferramenta InteractiVenn, evidenciando uma presença comum e significativa desses microrganismos na diversidade microbiana do solo analisado. Essa consistência destaca a importância dessas espécies na ecologia microbiana do ambiente estudado.

A espécie *Acidobacteria bacterium*, integrante do filo *Acidobacteria*, exibe ampla distribuição em ecossistemas variados, com sequências notavelmente abundantes nos solos, formando parte significativa da comunidade microbiana. Estas bactérias, apesar de desafiadoras de cultivar em laboratório, demandam pesquisas contínuas para compreender suas características fisiológicas e funções específicas, ressaltando a importância de desvendar seu papel nos ciclos biogeoquímicos e na ecologia do solo (KALAM et al., 2020).

A espécie *Thioploca ingrica* é um tipo de bactéria filamentosa encontrada em ambientes aquáticos, especialmente em sedimentos marinhos ricos em nutrientes e desempenham um papel crucial nos ciclos biogeoquímicos, participando ativamente na ciclagem de enxofre em ambientes aquáticos (JØRGENSEN et al., 2015).

Roseiflexus sp é uma bactéria fototrófica anaeróbica, pertencente ao grupo das bactérias verdes não sulfurosas. Essas bactérias têm a capacidade de realizar fotossíntese sem a produção de enxofre (BENNETT et al., 2020).

6. CONCLUSÕES

Foi possível classificar taxonomicamente os microrganismos produtores da enzima α -amilase nas amostras de solo. Um total de 87.472 microrganismos foram classificados.

Foram observadas variações estatisticamente significativas as espécies de microrganismos produtores de α -amilase. Segundo a análise estatística as espécies, *Acidobacteria bacterium*, *Thioploca ingrica*, *Anaerocolumna aminovalerica* e *Roseiflexus sp* foram as espécies predominantes nas comparações entre os solos, sendo encontradas em abundância em todas as amostras analisadas.

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

Esse trabalho oferece contribuições fundamentais para investigações subsequentes sobre microrganismos envolvidos na produção de α -amilase em amostras de solo. Esses achados estabelecem uma base valiosa para pesquisas futuras, abrindo caminho para a compreensão mais aprofundada dos processos biológicos.

7. REFERÊNCIAS

BREITWIESER, Florian P.; LU, Jennifer; SALZBERG, Steven L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1125-1136, 2019.

BROWN, William D., Nina Feinberg, Eleanor Stedman, Jean DeJace, and Andrew J. Hale. "**Dietzia cinnamomea: An increasingly recognized human pathogen.**" *IDCases* 29 (2022)

BENNETT, Anastacia C.; MURUGAPIRAN, Senthil K.; HAMILTON, Trinity L. Temperature impacts community structure and function of phototrophic Chloroflexi and Cyanobacteria in two alkaline hot springs in Yellowstone National Park. **Environmental microbiology reports**, v. 12, n. 5, p. 503-513, 2020.

BONO, José Antônio Maior; MACEDO, Manuel Cláudio Motta; TORMENA, Cássio Antônio. Qualidade física do solo em um latossolo vermelho da região sudoeste dos cerrados sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, p. 743-753, 2013.

CHEN, Kevin; PACHTER, Lior. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. **PLoS computational biology**, v. 1, n. 2, p. e24, 2005.

CHÁVEZ, Luis Fernando et al. **Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo.** **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1254-1261, 2011.

DE VRIES, Franciska T. et al. **Soil food web properties explain ecosystem services across European land use systems.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 35, p. 14296-14301, 2013.

DONAGEMMA, Guilherme Kangussu et al. Caracterização, potencial agrícola e perspectivas de manejo de solos leves no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 1003-1020, 2016.

DELGADO-BAQUERIZO, Manuel et al. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. **Science**, v. 359, n. 6373, p. 320-325, 2018.

DUNFIELD, Peter F., et al. "Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia." *Nature* 450.7171 (2007): 879-882.

DIAS, L. A. F. et al. **Sistemas de cultivo utilizados na cultura da soja e efeito sobre a comunidade microbiana do solo.** 2018.

FAROOQ, Muhammad Adeel et al. **Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review.** *Archives of Microbiology*, v. 203, p. 1281-1292, 2021.

FOROUTAN, Masoud et al. Bioinformatics analysis of ROP8 protein to improve vaccine design against *Toxoplasma gondii*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 62, p. 193-204, 2018.

FADIJI, Ayomide Emmanuel; AYANGBENRO, Ayansina Segun; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Metagenomic profiling of the community structure, diversity, and nutrient pathways of bacterial endophytes in maize plant. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 11, p. 1559-1571, 2020.

FUERST, John A., and Evgeny Sagulenko. **"Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function."** *Nature Reviews Microbiology* 9.6 (2011): 403-413.

Gangoiti, Joana, et al. **"Characterization of the *Paenibacillus beijingensis* DSM 24997 GtfD and its glucan polymer products representing a new glycoside hydrolase 70 subfamily of 4, 6- α -glucanotransferase enzymes."** *PLoS One* 12.4 (2017): e0172622.

HUSON, Daniel H. et al. **MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data.** *PLoS computational biology*, v. 12, n. 6, p. e1004957, 2016.

HERRERO, Mario et al. **Smart investments in sustainable food production: revisiting mixed crop-livestock systems.** *Science*, v. 327, n. 5967, p. 822-825, 2010.

HØGSLUND, Signe; NIELSEN, Jeppe Lund; NIELSEN, Lars Peter. **Distribution, ecology and molecular identification of *Thioploca* from Danish brackish water sediments.** *FEMS microbiology ecology*, v. 73, n. 1, p. 110-120, 2010.

JANSSEN, Peter H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JØRGENSEN, Bo Barker; TESKE, Andreas; AHMAD, Azeem. Thioploca. **Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria**, p. 1-12, 2015.

KORUCU, Tayfun; ARSLAN, Selcuk. **Effects of direct and conventional planting on soil properties and yield characteristics of second crop maize**. Journal of Agricultural Sciences, v. 15, n. 02, p. 157-165, 2009.

KAUR, Navjot et al. **Alpha- amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review**. Chemical Biology & Drug Design, v. 98, n. 4, p. 539-560, 2021.

KOMÁREK, Jiří; JOHANSEN, Jeffrey R. Filamentous cyanobacteria. In: **Freshwater Algae of North America**. Academic Press, 2015. p. 135-235.

KALAM, Sadaf et al. Recent understanding of soil acidobacteria and their ecological significance: a critical review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 580024, 2020.

КАДНИКОВ, В. В. et al. Геномный анализ бактерии некультивируемого филума Riflebacteria выявил пути органотрофного метаболизма и диссимиляционного восстановления железа. **Микробиология**, v. 89, n. 3, p. 334-343, 2020.

Kadnikov, Vitaly V., Andrey V. Mardanov, Alexey V. Beletsky, Andrey L. Rakitin, Yulia A. Frank, Olga V. Karnachuk, and Nikolai V. Ravin. "**Phylogeny and physiology of candidate phylum BRC1 inferred from the first complete metagenome-assembled genome obtained from deep subsurface aquifer**." Systematic and applied microbiology 42, no. 1 (2019): 67-76.

LAMBAIS, Marcio Rodrigues et al. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em ciência do solo**, v. 4, 2005.

Lopes, S. A., et al. "Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: 'Candidatus Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, 'Ca. L. americanus' is heat sensitive." *Plant Disease* 93.3 (2009): 257-262.

Lee, Soon Dong, Hong Lim Yang, and In Seop Kim. **"Four new Microbacterium species isolated from seaweeds and reclassification of five Microbacterium species with a proposal of Paramicrobacterium gen. nov. under a genome-based framework of the genus Microbacterium."** *Frontiers in Microbiology* 14 (2023): 1299950.

MOBINI-DEHKORDI, Mohsen; JAVAN, Fahime Afzal. **Application of alpha-amylase in biotechnology.** *J. Biol. Today World*, v. 1, n. 1, p. 39-50, 2012.

MCKAY, Elizabeth et al. Widespread occurrence of filamentous Thioploca bacteria in low-sulfate Great Lakes sediments with implications for sulfur and nitrogen cycling. **Journal of Great Lakes Research**, v. 49, n. 5, p. 1111-1122, 2023.

MASCARIN, Gabriel Moura; JARONSKI, Stefan T. **The production and uses of Beauveria bassiana as a microbial insecticide.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 1-26, 2016.

Moon, Kira, Ilnam Kang, Suhyun Kim, Sang-Jong Kim, and Jang-Cheon Cho. **"Genomic and ecological study of two distinctive freshwater bacteriophages infecting a Comamonadaceae bacterium."** *Scientific reports* 8, no. 1 (2018): 7989.

NAZIR, Asiya. **Review on metagenomics and its applications.** *Imp J Intersd Res*, v. 2, n. 10, 2016.

NOGI, Yuichi et al. *Psychromonas hadalis* sp. nov., a novel piezophilic bacterium isolated from the bottom of the Japan Trench. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1360-1364, 2007.

PRAYOGO, Fitra Adi et al. **Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review.** *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 18, p. 1-10, 2020.

PATIL, Anirudh G. et al. Fungal amylases and their industrial applications. **Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 2: Bioprospecting for Biomolecules**, p. 407-434, 2021.

PEREIRA, Rute; OLIVEIRA, Jorge; SOUSA, Mário. **Bioinformatics and computational tools for next-generation sequencing analysis in clinical genetics.** *Journal of clinical medicine*, v. 9, n. 1, p. 132, 2020.

PEREIRA, Alan Alves et al. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1397-1412, 2007.

PARKS, Donovan; BEIKO, RSTAMP. STAMP: statistical analysis of metagenomic profiles. Encyclopedia of metagenomics, p. 1-6, 2013.

RAMSDEN, Jeremy. **Bioinformatics: an introduction**. Springer Nature, 2023.

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.

SABIR, Muhammad Shehryar et al. Comparative effect of fertilization practices on soil microbial diversity and activity: an overview. **Current Microbiology**, v. 78, p. 3644-3655, 2021.

SILVA, Maria Regina Silveira Sartori et al. **Soil bacterial communities in the Brazilian Cerrado: Response to vegetation type and management**. Acta Oecologica, v. 100, p. 103463, 2019.

SUNDARRAM, Ajita; MURTHY, Thirupathihalli Pandurangappa Krishna. **α -amylase production and applications: a review**. Journal of Applied & Environmental Microbiology, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.

SOUZA, Maria Cecilia Silva et al. Assessment of macrobenthos diversity and a zoning proposal for Seixas coral reefs (northeastern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 195, p. 115443, 2023.

Smith, Garrett J., et al. "Members of the genus Methylobacter are inferred to account for the majority of aerobic methane oxidation in oxic soils from a freshwater wetland." *MBio* 9.6 (2018): 10-1128.

Saito, Yuki, Akira Shigehisa, Yohei Watanabe, Naoki Tsukuda, Kaoru Moriyama-Ohara, Taeko Hara, Satoshi Matsumoto, Hirokazu Tsuji e Takahiro Matsuki. **"Múltiplos transportadores e glicosídeo hidrolases estão envolvidos na utilização de oligossacarídeos derivados de arabinosilano em Bifidobacterium pseudocatenulatum."** Microbiologia Aplicada e Ambiental 86, no. 24 (2020)

SIKORSKI, Johannes et al. The evolution of ecological diversity in Acidobacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 715637, 2022.

THOMAS, Torsten; GILBERT, Jack; MEYER, Folker. A 123 of metagenomics. **Encyclopedia of Metagenomics. Springer**, p. 1-9, 2015.

Thi, Minh Tam Tran, David Wibowo, and Bernd HA Rehm. "**Pseudomonas aeruginosa biofilms.**" *International journal of molecular sciences* 21.22 (2020): 8671.

TANG, Chuiyun et al. **Response and dynamic change of microbial community during bioremediation of Uranium tailings by Bacillus sp.** *Minerals*, v. 11, n. 9, p. 967, 2021.

Ueki, Atsuko, et al. "**Descriptions of Anaerotaenia torta gen. nov., sp. nov. and Anaerocolumna cellulositytica gen. nov., sp. nov. isolated from a methanogenic reactor of cattle waste and reclassification of Clostridium aminovalericum, Clostridium jejuense and Clostridium xylanovorans as Anaerocolumna species.**" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66.8 (2016): 2936-2943.

VITOLO, Michele. **Brief review on enzyme activity.** *World Journal of Pharmaceutical Research*, v. 9, n. 2, p. 60-76, 2020.

van Bergeijk, Doris A., et al. "**Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery.**" *Nature Reviews Microbiology* 18.10 (2020): 546-558.

Van Der Meer, Marcel TJ, et al. "**Cultivation and genomic, nutritional, and lipid biomarker characterization of Roseiflexus strains closely related to predominant in situ populations inhabiting Yellowstone hot spring microbial mats.**" (2010): 3033-3042.

VAN GRINSVEN, Sigrid et al. Nitrate promotes the transfer of methane- derived carbon from the methanotroph *Methylobacter* sp. to the methylotroph *Methylotenera* sp. in eutrophic lake water. **Limnology and oceanography**, v. 66, n. 3, p. 878-891, 2021.

Waldrop, M. P., J. G. McColl, and R. F. Powers. "**Effects of forest postharvest management practices on enzyme activities in decomposing litter.**" *Soil Science Society of America Journal* 67.4 (2003): 1250-1256.

YANG, Yangyang et al. Influence of extracellular polymeric substances on cell-NPs heteroaggregation process and toxicity of cerium dioxide NPs to *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 1206-1216, 2018.

Zhang, Tian, et al. "**The hidden chemolithoautotrophic metabolism of *Geobacter sulfurreducens* uncovered by adaptation to formate.**" *The ISME journal* 14.8 (2020): 2078-2089.