

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**METAGENÔMICA DO MICROCOSMO DE SOLO SOB A APLICAÇÃO DE
FIPRONIL**

Suzana Eiko Sato Guima

Dourados – MS

2016

Suzana Eiko Sato Guima

**METAGENÔMICA DO MICROCOSMO DE SOLO SOB A APLICAÇÃO DE
FIPRONIL**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais como requisito básico para a obtenção do título de
bacharel em Biotecnologia.**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

Dourados – MS

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Rodrigo Matheus Pereira pela oportunidade de crescimento pessoal e de aprendizagem dentro da vasta e incrível área de Bioinformática sob a sua orientação. Este trabalho me proporcionou a oportunidade de dar o pontapé inicial para aprender a trabalhar com linhas de comando e com a linguagem básica de programação Python. Aprendi apenas a ponta do iceberg da metagenômica porém, também pude visualizar as inúmeras portas existentes dentro do universo da Bioinformática.

Agradeço à professora Dra. Maricy Raquel Lindenhah Bonfá por proporcionar conhecimentos na área de metagenômica e de suas aplicações, bem como aos seus alunos da área de metagenômica, que tiveram participações fundamentais para que este trabalho fosse possível. Pude aprender o quanto é importante a diversidade não só sob o aspecto microbiológico, mas também no intercâmbio de conhecimentos dentro da ciência. Agradeço à Dra. Camila Cesario Fernandes pela oportunidade em poder acompanhar o processo de sequenciamento na plataforma Ion Torrent PGM na UNESP de Jaboticabal, e ao Dr. Luciano Takeshi Kishi por compartilhar um pouco de seu conhecimento na área da Bioinformática. Agradeço a EMBRAPA Agropecuária Oeste por disponibilizar os solos para análise, ao Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala (LMSeq; Facility FAPESP) da UNESP de Jaboticabal pelo serviço de sequenciamento das amostras e à UFGD por proporcionar esta experiência de desenvolvimento do conhecimento científico e da pesquisa.

Agradeço aos meus colegas Rafael Correia da Silva, Ramir Bavaresco Junior e aos demais membros do grupo de Bioinformática da UFGD por toda a ajuda que me deram e por compartilhar conhecimentos dentro da área de metagenômica e bioinformática. À Karina Tamie Shirakawa, colega e amiga de curso que esteve me acompanhando desde o nosso primeiro trabalho de Bioinformática com peptídeos antimicrobianos, à Adrielle Ayumi de Vasconcelos, Juliana dos Santos Fernandes e aos demais colegas e amigos que também compartilharam experiências e diversos momentos durante a graduação. Agradeço também aos demais professores por toda a aprendizagem que me proporcionaram, tanto sobre as disciplinas como também sobre a vida.

Agradeço ao filósofo, escritor e educador Daisaku Ikeda, que por meio de suas palavras e seu exemplo de vida, têm me inspirado e encorajado em diversos momentos. Finalmente, agradeço à minha família e aos meus demais amigos que estiveram me apoiando e me acompanhando durante a minha jornada da graduação em Biotecnologia.

*“Quando perguntado sobre qual era a sua maior
peça, a resposta de Charles Chaplin era sempre a
mesma: 'A próxima!'*

*Não há impasse quando se está imbuído de desafio.
Não se anda porque existe um caminho; por andar
é que se abre o caminho.”*

(Daisaku Ikeda)

RESUMO

O fipronil é um inseticida utilizado amplamente na agricultura para controle de pragas porém, seu efeito sobre a comunidade bacteriana em solos ainda não é totalmente compreendido. Neste trabalho, o objetivo foi inferir a diversidade bacteriana a partir do gene 16S do RNA ribossomal em microcosmo de solo de floresta semidecidual sob aplicação de fipronil por 28 dias. Ensaios de microcosmo foram realizados com o solo de floresta semidecidual coletado da fazenda experimental da EMBRAPA Agropecuária Oeste, com aplicações semanais de fipronil durante quatro semanas. Os ensaios foram realizados em três réplicas. A partir do DNA extraído do microcosmo de solo, a biblioteca metagenômica das regiões hipervariáveis V4 e V5 do gene 16S do RNA ribossomal foi preparada e procedeu-se o sequenciamento na plataforma Ion Torrent PGM. As sequências foram processadas para análise por meio dos pipelines BMP (*Brazilian Microbiome Project*) e MICCA (*Microbial Community Analysis*) com adaptações. Os arquivos dos pipelines foram executados no programa STAMP para análise estatística. A predição funcional foi realizada por meio do programa PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*). As diferenças estatísticas ocorreram a partir do nível taxonômico de classe. Tanto o pipeline BMP quanto MICCA resultaram em classes similares, enquanto os gêneros foram diferentes. A principal diferença entre ambos os *pipelines* é a etapa de agrupamento de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), na qual *singletons* (OTUs representadas por uma sequência única de DNA) são descartados no BMP enquanto no MICCA isso não ocorre. *Streptomyces* foi o gênero que apresentou maior diferença de proporção para o controle. Isso poderia indicar que o grupo é susceptível ou apresenta crescimento inibido pelo fipronil. Entretanto, o efeito do fipronil sobre esse gênero ainda não foi reportado na literatura. A predição funcional apresentou enzimas diferentes para os dados de ambos os pipelines.

Palavras-chave: 16S rRNA, Ion Torrent PGM, sequenciamento de gene alvo, ecologia microbiana, pesticida

ABSTRACT

Fipronil is an insecticide widely used in agriculture for pest control. However, its effect on the bacterial community in soil is still not completely understood. In this study, the goal was to infer the bacterial diversity from the 16S ribosomal RNA gene in microcosm of semideciduous forest soil under application of fipronil for 28 days. Microcosm experiments were performed with the semideciduous forest soil collected from the experimental farm of Embrapa Agropecuária Oeste, with weekly applications of fipronil for four weeks. Assays were performed in three replicates. From the DNA extracted from microcosm soil, the metagenomic library of V4 and V5 hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA was prepared and sequencing was carried on Ion Torrent PGM platform. Sequences were processed for analysis on BMP (Brazilian Microbiome Project) and MICCA (Microbial Community Analysis) pipelines with adaptations. Files from the pipelines were run in STAMP software for statistical analysis. Functional prediction was performed using PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of unobserved States) software. Statistical differences occurred on the taxonomic level of class. Both BMP and MICCA pipelines resulted in similar classes, while genus were different. The main difference between both pipelines is the step of Operational Taxonomic Units (OTUs) clustering, which singletons (OTUs represented by a single DNA sequence) are discarded in BMP while MICCA does not discard them. *Streptomyces* was the genus with the highest difference in proportion for control. This fact may indicate the group is susceptible to fipronil or the pesticide inhibits its growth. However, the effect of fipronil on this genus has not been reported in the literature. The functional prediction presented different enzymes from both pipelines.

Keywords: 16S rRNA, Ion Torrent PGM, targeted sequencing, microbial ecology, pesticide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	Geral	12
2.2	Específicos	12
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1	Fipronil	13
3.2	Diversidade microbiana em solos	16
3.3	Metagenômica de Solos	17
3.4	Medidas de Diversidade	20
3.5	Sequenciamento Ion-Torrent	22
3.6	Ferramentas computacionais para análise metagenômica.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Coleta do material	26
4.2	Microcosmo das amostras de solo	27
4.3	Amplificação e sequenciamento das regiões V4 e V5 do gene 16S	27
4.4	Análise de dados	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A – Análise química do solo coletado	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula química estrutural do fipronil	13
Figura 2 – Vias de degradação do fipronil	16
Figura 3 – Regiões ITS1 e ITS2 do gene ribossomal eucarioto	18
Figura 4 – Regiões conservadas e hipervariáveis do gene ribossomal 16S	19
Figura 5 – Conformação 2D e 3D do RNA ribossomal 16S	20
Figura 6 – Coordenadas da coleta da amostra	26
Figura 7 – Distribuição da qualidade Q (Phred) das bases ao decorrer da posição nos <i>reads</i> brutos.....	32
Figura 8 – Distribuição da frequência dos <i>reads</i> brutos por tamanho	33
Figura 9 – Porcentagem de <i>reads</i> que restariam após a filtragem com corte.....	34
Figura 10 – Curva de rarefação	35
Figura 11 – Etapas dos <i>pipelines</i> BMP e MICCA.....	36
Figura 12 – Análise de PCoA.....	38
Figura 13 – Proporções médias dos filios entre os tratamentos	40
Figura 14 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA	41
Figura 15 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP	41
Figura 16 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando <i>singletons</i>	41
Figura 17 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA	42
Figura 18 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP.....	42
Figura 19 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando <i>singletons</i>	43
Figura 20 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA	44
Figura 21 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP.....	45
Figura 22 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando <i>singletons</i>	45

Figura 23 – Proporção média de proteínas preditas e diferença na média de proporções entre os tratamentos a partir de dados do MICCA	48
Figura 24 – Proporção média de proteínas preditas e diferença na média de proporções entre os tratamentos a partir de dados do BMP	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo de dados das OTUs	37
Tabela 2 – Índices de alfa-diversidade.....	39

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, agroquímicos têm sido aplicados de forma intensiva a fim de controlar populações de insetos-praga e ectoparasitas e, entre os inseticidas, a utilização de fipronil têm aumentado em larga escala (SIMON-DELSO et al., 2015). O fipronil é um inseticida orgânico que faz parte da família dos fenil pirazóis (TINGLE et al., 2003) e sua aplicação pode ocorrer na agricultura, veterinária e em residências para controle de baratas, formigas e cupins (ANVISA, 2016). Apesar de sua eficácia, existem preocupações quanto ao seu efeito à integridade humana e de animais (TINGLE et al., 2003; SILVA; KOSHLUKOVA, 2015). Ambientalmente, o fipronil apresenta riscos de contaminação residual (BONMATIN et al., 2015) e toxicidade sobre espécies de fauna (GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015) e a sua utilização, assim como outros inseticidas (ZHANG et al., 2015), pode alterar a estrutura e composição de comunidades bacterianas do solo próximo ao local de aplicação.

Os microrganismos apresentam funções importantes sobre o ciclo biogeoquímico (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008) e na funcionalidade de ecossistemas do solo (WAGG et al., 2014), tais como decomposição e ciclagem de nutrientes. Relações de simbiose também ocorrem entre microrganismos e plantas (SUBRAMANIAN; SMITH, 2015). O conhecimento sobre a diversidade microbiana de solo possibilita uma melhor compreensão sobre a dinâmica ecológica local, monitoramento da qualidade do solo (HARRIS, 2003; ANDERSON, 2007; NIEPCERON et al., 2013), além da bioprospecção de microrganismos produtores de biomoléculas com potencial de aplicação molecular, ambiental, clínica ou industrial (COUGHLAN et al., 2015; SUBRAMANIAN; SMITH, 2015; UFARTÉ et al., 2015; FERRER et al., 2016).

Devido aos possíveis impactos da aplicação de fipronil sobre o solo, estudos sobre microrganismos com potencial de biodegradação tornam-se de grande interesse ambiental. Diversos microrganismos que apresentam capacidade biorremediadora sobre o fipronil têm sido isolados e estudados (MANDAL et al., 2013; MANDAL et al., 2014; UNİYAL et al., 2016a, UNİYAL et al., 2016b). Embora a maior parte desses estudos foi realizada a partir do isolamento desses microrganismos, mais de 99% dos microrganismos não são cultiváveis em meios de cultivo (TORSVIK; SØRHEIM; GOKSØYR, 1996; SCHMEISSER; STEELE; STREIT, 2007). Desse modo, a metagenômica (método independente de cultivo) possibilita explorar o material genético desses microrganismos não cultiváveis e ainda não totalmente explorados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar a análise metagenômica usando o gene da subunidade 16S do RNA ribossomal para inferir a diversidade bacteriana em microcosmo sob a aplicação de fipronil.

2.2 Específicos

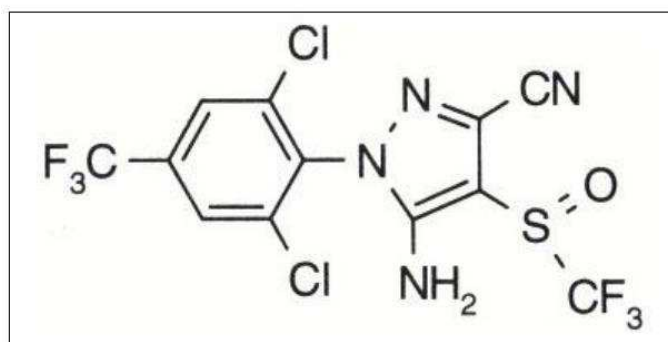
- Verificar as possíveis alterações das classes bacterianas presentes em solo sob a aplicação de fipronil após 28 dias;
- Realizar a comparação entre os pipelines BMP (*Brazilian Microbiome Project*) e MICCA (*Microbial Community Analysis*);
- Realizar a predição funcional das bactérias observadas em solo com fipronil.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fipronil

Fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila; $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$) é um inseticida orgânico heterocíclico descoberto e desenvolvido por Rhône-Poulenc entre os anos de 1985 e 1987 (TINGLE et al., 2003). Esse composto faz parte da família dos fenil pirazóis e contém seis átomos de flúor, quatro de nitrogênio, dois de cloro e um sulfóxido (Figura 1) (TINGLE et al., 2003; ANVISA, 2016).

Figura 1 – Fórmula química estrutural do fipronil



Fonte: ANVISA (2016)

Mundialmente, a utilização do fipronil ocorre em larga escala (SIMON-DELSO et al., 2015), tanto em aplicações agrícolas como fitossanitárias e veterinárias. No Brasil, o uso agrícola desse composto é autorizado pela ANVISA (2016) conforme o local da aplicação (folhas, sementes, mudas), a concentração e o tempo de intervalo entre as aplicações. O fipronil pode ser utilizado em culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, milho, soja e sementes de cevada, feijão, pastagens, trigo e mudas de eucalipto (ANVISA, 2016). Diversos estudos têm demonstrado o sucesso e a eficácia do uso de fipronil no controle de insetos como formigas (ULLOA-CHACÓN; JARAMILLO, 2003; GANDRA et al., 2016), besouros (FETTIG et al., 2010; MORALES-RODRIGUEZ; WANNER, 2015) traças (ASARO; CREIGHTON, 2011) e tripes (KAY; HERRON, 2010).

O uso não agrícola e o emprego em residências é permitido no Brasil pela ANVISA (2016) dentro de determinados limites de concentrações máximas que variam conforme o tipo de formulação (gel, pó, líquido, pasta). O fipronil pode ser usado também como preservante de

madeira e domesticamente no controle de formigas e baratas. Na medicina veterinária, o fipronil é utilizado no controle de parasitas. O fipronil encontra-se comercialmente disponível na forma tópica (*pour-on*) para o controle de carrapato em gados. Cid e colaboradores (2016) conduziram um estudo sobre a aplicação de fipronil via subcutânea (forma injetável) em gados. Eles demonstraram a eficácia de 82,41% do fipronil contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*. Em outro estudo, Kužer e colaboradores. (2013) confirmaram a eficácia de uma formulação comercial contendo fipronil no controle de pulgas, carrapatos e piolhos em cães, demonstrando rápida redução desses parasitas após a administração tópica da formulação. Também foi reportada a eficiência da utilização tópica de fipronil com outras formulações contra infecções de nematoides (*Ancylostoma* spp.) de gatos (PRULLAGE et al., 2014).

A ação inseticida do fipronil ocorre por meio da inibição do canal de cloreto ligado ao receptor ácido gama aminobutírico (GABA) no sistema nervoso (ZHAO et al., 2003). Os receptores GABA inibem a atividade neural e previnem o estímulo excessivo dos nervos. O fipronil bloqueia a ação reguladora desses receptores, o que leva a uma hiperexcitação neural e conseqüentemente à morte do inseto. O fipronil apresenta maior seletividade e afinidade ao receptor GABA de insetos do que de mamíferos (RATRA; CASSIDA; 2001).

Além do receptor GABA, outros estudos reportaram o efeito do fipronil sobre os receptores dos canais cloreto ativados por glutamato mais específicos para insetos do que em vertebrados, e devido a esse fato, o efeito do fipronil é mais efetivo neles do que em mamíferos (BLOOMQUIST, 2003; ZHAO et al., 2003; NARAHASHI et al., 2007; NARAHASHI et al., 2010).

Apesar da eficiência do fipronil como inseticida e da baixa afinidade do fipronil em receptores de mamíferos, há preocupações quanto à toxicidade e efeitos adversos do fipronil e seus metabólitos sobre a integridade humana e de animais. Além do efeito sobre o sistema nervoso central, o fipronil pode afetar outros órgãos. No fígado, o fipronil causa alterações morfológicas no tecido hepático, com desorganização celular e citoplasmática dos hepatócitos e possível ocorrência de fagocitose e morte celular nesse órgão (FERREIRA, 2010). Estudos relataram diversos efeitos às células hepatócitas de camundongos associados ao aumento da concentração do fipronil e de seus metabólitos (fipronil dessulfínil e fipronil sulfona). Entre esses efeitos, a toxicidade do fipronil inibiu a atividade mitocondrial, o que levou à diminuição da síntese de ATP e, conseqüentemente, a uma alteração na homeostasia intracelular de Ca^{2+} , resultando em morte celular (GUELFÍ et al., 2015; TAVARES, 2015). Em camundongos, o tratamento oral com fipronil (administração de 10mg/kg) induziu sinais de inflamação no

pulmão (MERKOWSKY et al., 2016) bem como o aumento da pressão arterial sistólica (com administração de 30mg/kg/dia) (CHAGURI et al., 2016).

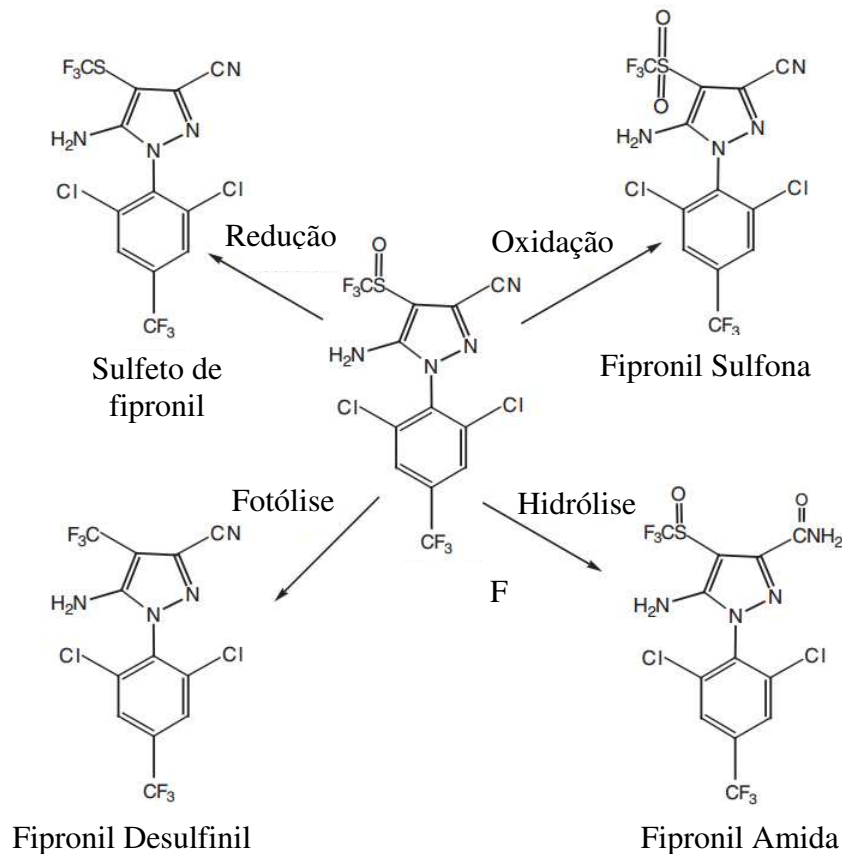
A preocupação sobre os impactos ambientais resultantes da utilização de fipronil também é crescente. O fipronil apresenta riscos significativos que incluem a contaminação residual de solos e ambientes aquáticos e o consequente efeito tóxico sobre comunidades e espécies de fauna presentes nesses locais (WU et al., 2014; LOPEZ-ANTIA et al., 2015; PISA et al., 2015; WU et al., 2015). Estudos têm reportado a associação entre o fipronil e a diminuição das populações de insetos de grande importância econômica e ecológica como as abelhas *Apis mellifera* (SOUZA, 2009; ZALUSKI et al, 2015).

O período de degradação do fipronil é muito variável. Ao analisar a degradação desse defensivo agrícola no solo com diferentes resíduos orgânicos do cultivo e processamento da cana-de-açúcar, Silva e colaboradores (2016) verificaram que a meia-vida do fipronil variou de 15 a 105 dias. Ying e Kookana (2002) encontraram a meia-vida variando entre 68 e 217 dias. Por sua vez, no experimento de Masutti e Mermut (2007), a meia-vida ocorreu entre 83 e 200 dias. O tempo de meia-vida pode ser influenciado pelas características que o solo apresenta como a compactação dos grãos do solo, o conteúdo de matéria orgânica, a biodisponibilidade de fipronil relacionado à sua adsorção no solo, o pH e a temperatura. Geralmente, a degradação do fipronil é mais lenta em solos ricos em matéria orgânica (MASUTTI, MERMUT, 2007).

Os principais produtos resultantes da degradação do fipronil são fipronil sulfona, sulfeto de fipronil (*sulfide*), fipronil dessulfenil e fipronil amida (YING; KOOKANA, 2002; MASUTTI; MERMUT, 2007), compostos que podem ser considerados mais tóxicos e persistentes no ambiente aquático do que o fipronil (QU et al., 2016). A figura 2 apresenta as vias que resultam nos produtos de degradação do fipronil. O fipronil dessulfenil é o produto resultante da fotólise do fipronil. Ying e Kookana (2002), ao avaliar os produtos da degradação do fipronil, verificaram uma concentração elevada de fipronil desulfenil no experimento realizado em campo – na qual o fipronil foi aplicado na superfície do solo e exposto aos raios solares – enquanto no laboratório sob condições de escuridão, não foi detectado o derivado desulfenil. O sulfeto de fipronil é formado pela redução do fipronil, enquanto o fipronil sulfona é formado pela oxidação. O fipronil amida é formado pela hidrólise do fipronil. Os derivados sulfona, sulfeto e amida foram detectados tanto em solos estéreis como não estéreis em experimentos que avaliam a degradação do fipronil, porém, a concentração desses metabólitos foi maior em solos não estéreis, indicando que os microrganismos podem influenciar e acelerar a transformação do fipronil em seus derivados sulfona, sulfeto e amida (YING; KOOKANA, 2002; MASUTTI; MERMUT, 2007). Entretanto, a via de degradação do fipronil e os

microrganismos que participam em cada etapa dessa via ainda não foram completamente elucidados.

Figura 2 – Vias de degradação do fipronil



Fonte: YING, KOOKANA (2002)

3.2 Diversidade microbiana em solos

Estudos sobre a diversidade microbiana contida em um grama de solo demonstraram que esse habitat pode ser considerado o tipo de ambiente com a maior diversidade bacteriana (ROESCH et al., 2007). Tais microrganismos apresentam papel fundamental no ciclo biogeoquímico do solo (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008) e na funcionalidade de ecossistemas do solo (WAGG et al., 2014). Devido à sua importância na decomposição e na ciclagem de nutrientes de solo, o conhecimento da comunidade microbiana presente nesse ambiente possibilita entender a dinâmica ecológica existente, bem como utilizá-los como ferramentas bioindicadores e de monitoração da qualidade do solo (HARRIS, 2003; ANDERSON, 2007; NIEPCERON et al., 2013) e para a bioprospecção de potenciais enzimas com aplicação biotecnológica nas áreas industrial, agrícola, clínica, veterinária e ambiental.

Diversos fatores influenciam a composição microbiana nos solos. A aplicação de agroquímicos sobre o solo altera as características físico-químicas bem como a estrutura e a composição da comunidade bacteriana desse habitat. Apesar da mudança na microbiota do solo, a funcionalidade do ecossistema de solos é mantida por meio de estratégias baseadas na riqueza de diversidade e na abundância de microrganismos. O equilíbrio do ecossistema de solos de florestas é mantido pela baixa diversidade e alta abundância de microrganismos enquanto solos agrícolas e de pastagens apresentam maior diversidade microbiana, porém, alta redundância funcional (microrganismos distintos que apresentam funções similares). A redundância funcional é o que garante a funcionalidade do ecossistema mesmo após a conversão do solo (MENDES et al., 2015).

Estudos de diversidade microbiana podem ser realizados por meio do isolamento, identificação e caracterização dos microrganismos presentes no solo. Entretanto, menos de 1% da diversidade microbiana pode ser identificada por métodos dependentes de cultivo uma vez que nem todos os microrganismos são cultiváveis (TORSVIK; SØRHEIM; GOKSØYR, 1996; SCHMEISSER; STEELE; STREIT, 2007). A fim de contornar este problema, métodos independentes de cultivo têm sido utilizados para investigar, classificar e manipular sistematicamente o material genético total de amostras ambientais do solo, possibilitando o estudo da microbiota de solos (SHARMA; VAKHLU, 2014).

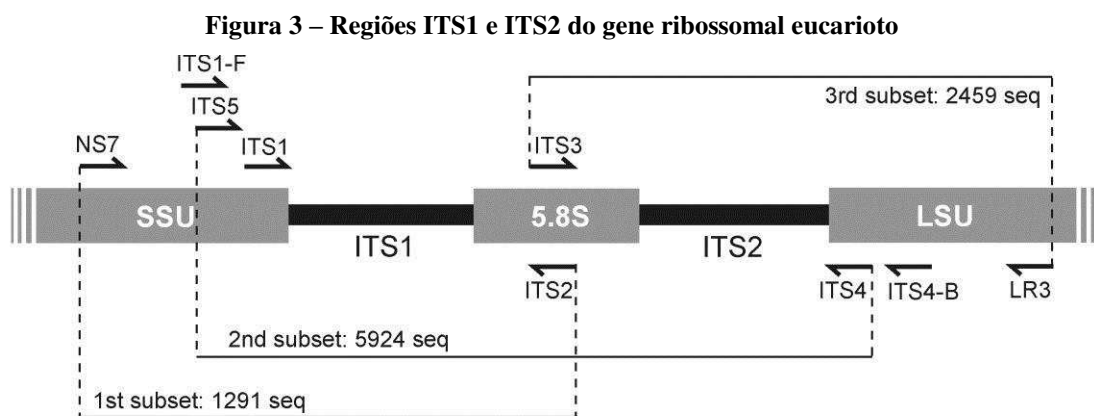
3.3 Metagenômica de Solos

Diferentemente dos estudos dependentes de cultivo, em métodos independentes de cultivo (metagenômica), não ocorre o isolamento e cultivo de microrganismos. A metagenômica preocupa-se com a extração, a clonagem e a análise do DNA total referente à amostra do habitat (HANDELSMAN et al., 1988). Por possibilitar o estudo de microrganismos não cultiváveis, a metagenômica apresenta-se como uma ferramenta promissora no estudo de comunidades microbianas, da diversidade de genes individuais e de seus produtos, bem como de *operons* que codificam vias de síntese ou degradação de compostos (SCHMEISSER; STEELE; STREIT, 2007). Além disso, por meio da identificação de comunidades microbianas, é possível realizar a caracterização do solo e o estudo da funcionalidade das comunidades de diversas espécies, bem como a bioprospecção *in silico* de produtos de interesses biotecnológicos.

Os métodos de análises metagenômicas podem ser caracterizados em duas vertentes: não seletivo – conhecido como *whole metagenome sequencing* (WMS) ou *whole genome*

shotgun (WGS) *sequencing* (MANOHARAN et al, 2015) – e sequenciamento dirigido em alvo – conhecido como *targeted sequencing* ou *targeted metagenomics*. WMS consiste em realizar o sequenciamento *shotgun* da amostra de DNA indiscriminadamente. Por sequenciar aleatoriamente o DNA existente na amostra, WMS resulta em uma quantidade massiva de sequências a serem agrupadas (processo conhecido como *assembly*) e analisadas, o que requer um alto poder computacional (SUENAGA, 2012). No método de *targeted sequencing*, sequências específicas da amostra são amplificadas e sequenciadas, reduzindo a complexidade genética de dados a serem processados e analisados. Mesmo focando em sequências-alvos, *targeted metagenomics* pode fornecer uma ampla cobertura, revelando áreas específicas do metagenoma ligadas à função ecológica e estrutura da comunidade microbiana (SUENAGA, 2012).

Para inferir a diversidade fúngica por *targeted metagenomics*, a identificação é baseada em regiões ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*, espaçador interno transcrito) (Figura 3). O ITS1 é a região existente entre os genes ribossomais 18S e 5.8S enquanto o ITS2 está entre os genes ribossomais 5.8S e 28S (BELLEMAIN et al., 2010; SCHOCH et al., 2014).

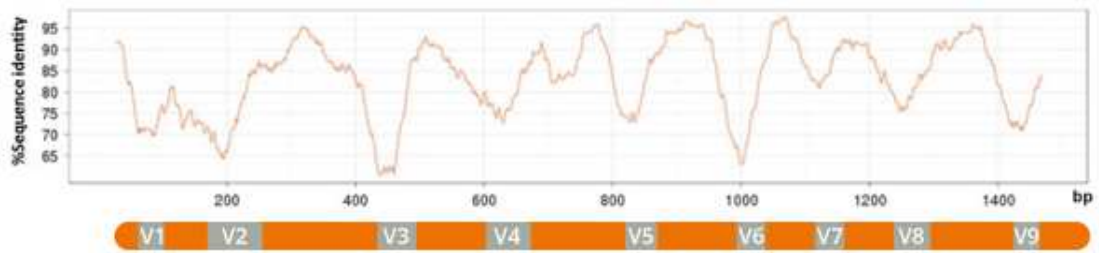


Fonte: BELLEMAIN et al. (2010)

SSU = Subunidade ribossomal pequena 18S (*Small Subunit*); LSU = Subunidade ribossomal grande 28S (*Large Subunit*). ITS = Espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer*)

Para a identificação de grupos específicos de bactérias, o gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) é o marcador gênico filogenético mais utilizado (SCHEISSER; STEELE; STREIT, 2007). O gene 16S do rRNA consiste em nove regiões altamente conservadas – ideais para o desenho de *primers* – intercaladas com nove regiões hipervariáveis – necessárias para a identificação filogenética de bactérias (Figura 4).

Figura 4 – Regiões conservadas e hipervariáveis do gene ribossomal 16S

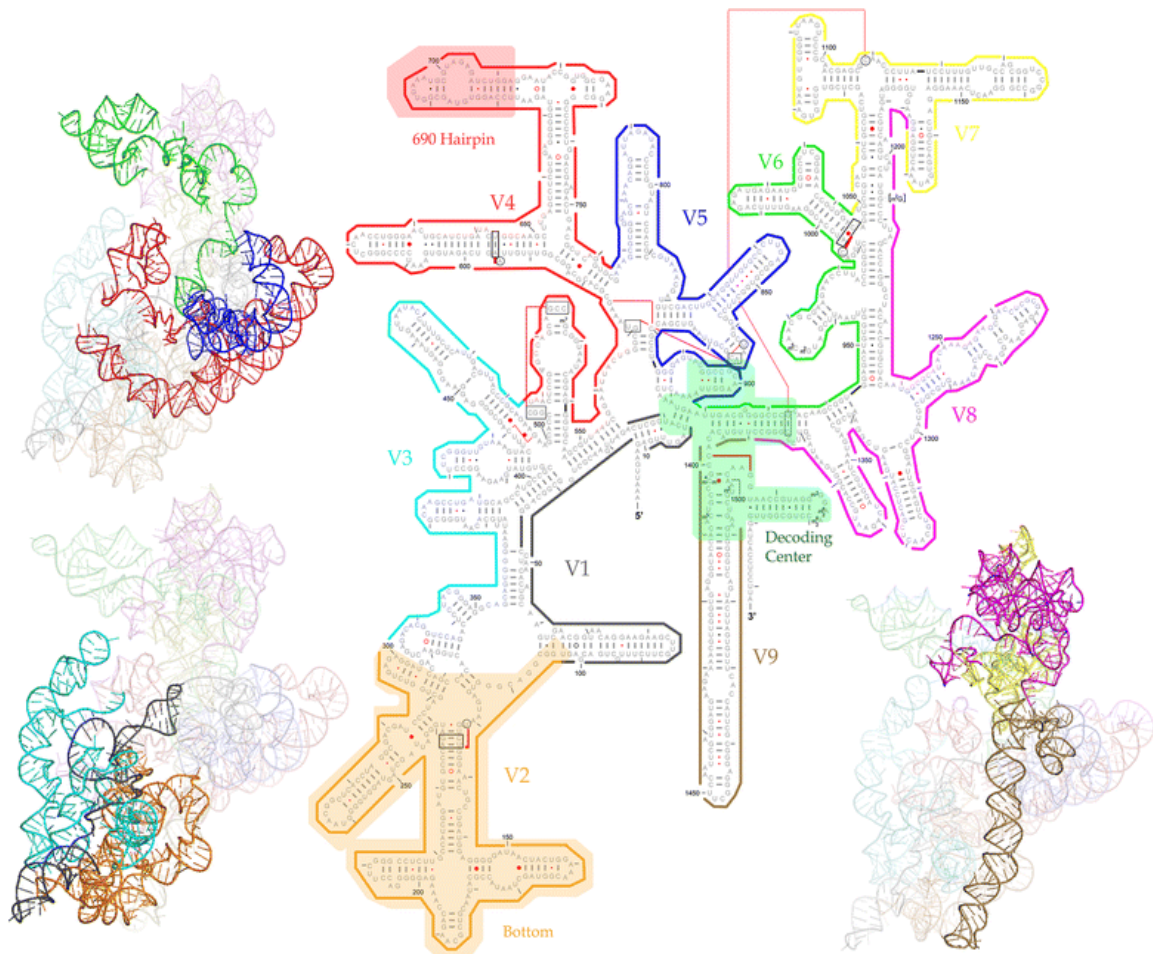


Fonte: GATC Biotech (disponível em: <http://www.gatc-biotech.com/>)

Eixo x: posição dos nucleotídeos no gene 16S do rRNA; Eixo y: % de identidade entre as sequências do gene 16S de rRNA. Em laranja, regiões conservadas. Em cinza, regiões hipervariáveis (V1 a V9)

O comprimento dessas regiões hipervariáveis varia de aproximadamente 50pb a 100pb (PETROSINO et al., 2009). Estudos sobre a sensibilidade das regiões hipervariáveis do gene 16S do rRNA em análises filogenéticas indicaram que as regiões V4-V6 são as regiões que apresentam maior confiabilidade e resolução para a representação bacteriana a nível de filo. As causas da correlação entre diferentes sub-regiões e a resolução filogenética ainda permanecem desconhecidas (YANG; WANG; QIAN, 2016). Sabe-se apenas que a região V4 faz parte da estrutura *hairpin* e que as regiões V5 e V6 fazem parte do centro de decodificação do rRNA 16S (Figura 5).

Figura 5 – Conformação 2D e 3D do RNA ribossomal 16S



Fonte: YANG, WANG, QIAN (2016)

Regiões correspondentes estão identificadas pelas mesmas cores em ambas as estruturas 2D e 3D.

3.4 Medidas de Diversidade

A fim de se compreender a diversidade e funcionalidade de um grupo de indivíduos dentro de uma comunidade, o conhecimento sobre a ecologia, parâmetros e formas de mensuração da diversidade microbiana torna-se necessário. A quantificação da biodiversidade está associada aos conceitos de riqueza e equabilidade. A riqueza é o número ou variedade de espécies de uma comunidade enquanto a equabilidade refere-se ao total de indivíduos encontrados em cada espécie. Ambos os conceitos são utilizados em índices de diversidade (métodos matemáticos) a fim quantificar a biodiversidade existente em uma comunidade (PALLMANN et al, 2012).

Dois dos índices de diversidade mais comuns são o de Simpson (SIMPSON, 1949) e o de Shannon-Wiener (SHANNON, 1949). O índice de Simpson pode ser interpretado como a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente em uma comunidade sejam

espécies diferentes e, portanto, esse índice avalia a equabilidade, isto é, a uniformidade da abundância encontrada entre as espécies. É conhecido também como índice de dominância, pois quanto maior o valor desse índice, maior a abundância de um ou algumas espécies em relação às demais (PALLMANN et al., 2012). Por sua vez, o índice de Shannon atribui peso a cada espécie de acordo com a sua frequência relativa dentro de uma comunidade, atribuindo maior peso a espécies raras (MELO, 2008). O valor desse índice aumenta quanto maior o número de espécies. O valor será zero se na amostra houver apenas uma espécie, e será maior quanto maior o número de espécies encontradas (PYLRO et al., 2014). Assim, o índice de Shannon considera mais a riqueza (número) de espécies do que o índice de Simpson, sendo que este último atribui peso maior às espécies comuns (MELO, 2008).

Outro índice que mensura a diversidade é o índice PD (*Phylogeny Diversity*) *Whole Tree*. Esse índice baseia-se em uma árvore filogenética na qual, comprimentos do ramo são somados como uma medida de diversidade. Se uma OTU é encontrada e é proximamente relacionada a outra OTU na amostra, o índice de diversidade terá um pequeno aumento. Caso a OTU seja de uma linhagem nova, o índice de diversidade terá um aumento maior (PYLRO et al., 2014).

Existem alguns índices mais simples que descrevem a diversidade local e regional como a alfa, beta e gama-diversidade. A alfa-diversidade consiste no número de espécies encontrado em um habitat ou comunidade. Por sua vez, a beta-diversidade refere-se à variação da diversidade de um habitat para outro, isto é, à diferença de espécies existentes entre dois ou mais habitats ou comunidades (MAGURRAN, 2004). A gama-diversidade refere-se à diversidade em uma grande área, bioma, continente, ilha, isto é, ao número total de espécies encontrado em todos os habitats de um amplo espaço (NOGUEIRA et al., 2008).

Uma forma de analisar a alfa-diversidade de uma amostra é a curva de rarefação. As curvas de rarefação podem ser construídas a partir do número de espécies encontradas em uma amostra. Esse tipo de gráfico estima a representatividade (cobertura) da amostra de DNA sequenciada, apresentando o número de espécies em função do número de sequências de DNA. Quando o final da curva apresenta uma inclinação plana (menos íngreme), significa que a adição de um maior número de sequências contribui pouco (ou nada) para informar uma espécie ou OTU (Unidade Taxonômica Operacional) nova (WOOLEY; GODZIK; FRIEDBERG; 2010). Quando isso ocorre, diz-se que a curva de rarefação atingiu a estabilidade, isto é, que a amostra é representativa.

3.5 Sequenciamento Ion-Torrent

O sequenciamento de DNA é uma técnica fundamental que tem possibilitado a obtenção da diversidade microbiana de diversos ambientes (CHUN et al., 2010; MIDDELBOSS et al., 2010; NAM; LEE; LIM, 2012; SCHMITT; HENTSCHEL; TAYLOR, 2012; GOTTEL et al., 2011). Entre os sequenciamentos de nova geração (NGS; *next generation sequencing*), o pirosequenciamento 454 (Roche ®) foi o primeiro método de sequenciamento utilizado para estudos metagenômicos baseada no rRNA 16S devido ao tamanho médio longo de sua sequência (GLENN, 2011). O sequenciamento do Ion Torrent apresentava como limitação a geração de sequências menores que 250pb (GLENN, 2011). Entretanto, no começo de 2013, o lançamento do sequenciamento por Ion Torrent que geram sequências de até 400pb possibilitou o avanço de estudos metagenômicos utilizando esse método de sequenciamento, com sequências de tamanhos comparáveis ao pirosequenciamento 454 (FUJIMOTO et al., 2014).

No Ion Torrent, o sequenciamento baseia-se na leitura de bases nucleotídicas por síntese. A DNA polimerase, ao incorporar uma base nucleotídica, libera íons hidrônio (H⁺) que são detectados por um sensor sensível ao pH conhecido como pHFET (*pH-sensitive field effect transistor*) (MERRIMAN et al., 2012). Devido à utilização de chips semicondutores de design e manufatura comum e padrão como os microchips de computadores comerciais existentes (MERRIMAN et al., 2012), o sequenciamento por Ion Torrent apresenta como vantagem a geração de um enorme número de sequências por um baixo custo (GLENN, 2011). Além disso, a aplicação do princípio do pH nessa técnica significa que lasers, câmeras e corantes fluorescentes não são necessários, o que abaixa ainda mais o custo dessa técnica (GLENN, 2011).

3.6 Ferramentas computacionais para análise metagenômica

Avanços no sequenciamento e na velocidade do processamento de informações computacionais têm possibilitado maior obtenção de informação genética e estudos baseados nesses dados. O número de sequências depositado nos bancos de dados tem aumentado e isto requer cada vez mais análises e anotações para a identificação e caracterização dessas sequências.

Devido à natureza dos dados metagenômicos – como o grande volume de dados, a heterogeneidade das sequências (sequências genéticas de diversos microrganismos misturados na amostra) e sequências algumas vezes incompletas – a análise torna-se complexa e novos

métodos computacionais são requeridos. Diversas ferramentas computacionais, bancos de dados acurados e *pipelines* – conjunto de programas que fazem parte de um procedimento em etapas, desde a filtragem dos dados brutos até a geração de gráficos e análises estatísticas – têm sido disponibilizados a fim de facilitar a análise das sequências (GLASS; MEYER, 2012).

Alguns *pipelines* disponíveis para *whole metagenome sequencing* são a Plataforma Galaxy (GOECKS; NEKRUTENKO; TAYLOR, 2010), MetAMOS (TREANGEN, 2013), IMG/M (MARKOWITZ et al., 2014), MIDAS (NAYFACH et al., 2015) sendo o *Metagenomics RAST* (MG-RAST) (MEYER et al., 2008) o mais utilizado (GLASS; MEYER, 2012).

A plataforma Galaxy consiste em um servidor público aberto que integra um conjunto de ferramentas computacionais e bancos de dados. O usuário pode baixar e instalar em seu servidor, explorar e integrar ferramentas, bancos de dados e outros recursos de sua escolha, personalizando o ambiente e compartilhando seu conjunto de ferramentas escolhidos. Devido à essa característica, a plataforma têm se tornado popular e muitos grupos científicos têm desenvolvido suas próprias ferramentas e integrado-as ao seu ambiente de trabalho (LADOUKAKIS; KOLISIS; CHATZIIOANNOU, 2014).

MetAMOS é um *pipeline* que realiza *assembly* (agrupamento dos *reads*) e análises metagenômicas. Tanto sequências brutas como *contigs* já agrupados são aceitos. Requer instalação e a sua execução ocorre por *scripts* em Python. Uma ampla variedade de ferramentas pode ser integrada possibilitando a análise completa de um conjunto de dados metagenômicos a partir de dados brutos. Apesar do conjunto rico de ferramentas, a sua interface não é amigável e deve ser executada pelo terminal de comandos do Linux (LADOUKAKIS; KOLISIS; CHATZIIOANNOU, 2014). Assim como MetAMOS, MIDAS apresenta as mesmas características de requerer instalação local, Python e execução por meio de linhas de comando no Linux.

O IMG/M é um sistema de análises e administração de dados de metagenômica e fornece banco de dados de genomas bacterianos, de arqueas, e alguns organismos eucarióticos, além de ferramentas para explorar os dados e realizar análises comparativas. Apesar de apresentar um sistema amigável, os *reads* devem ser filtrados por qualidade e devem também passar pelo processo de *assembly* antes de serem submetidos para análise. Não há instalação local disponível e todos os usuários devem criar uma conta pelo website do IMG (LADOUKAKIS; KOLISIS; CHATZIIOANNOU, 2014).

MG-RAST é um servidor que aceita dados de sequências de DNA em diferentes formatos, incluindo FASTA. Fornece inicialmente controle de qualidade e normalização de dados das sequências. O usuário pode escolher entre enviar os *reads* brutos ou *contigs* após o

assembly. O servidor fornece análises de reconstruções filogenéticas e metabólicas bem como comparações entre as anotações de um ou mais metagenomas e genomas (MEYER et al., 2008). Não há instalação local e os usuários devem criar uma conta e submeter suas sequências e metadados pelo website do MG-RAST. Dados submetidos com a opção de serem públicas possuem prioridade de análise sobre dados privados.

Nos programas de análise metagenômica, a taxonomia geralmente é estimada por meio de comparações contra banco de dados de sequências conhecidas. O programa MEGAN (HUSON et al., 2007) é uma alternativa que permite a análise de um grande conjunto de dados metagenômicos. Por utilizar o método de comparação como o BLAST, não há a necessidade de se realizar o *assembly* ou utilizar marcadores filogenéticos específicos. O programa computa e explora os dados, apresentando resultados gráficos e estatísticos para comparar diferentes conjuntos de dados (HUSON et al., 2007).

Para as análises *target sequencing* (sequenciamento de genes alvos), alguns dos *pipelines* disponíveis são BioMas (FOSSO et al., 2015), RDP (COLE et al., 2014), LotuS (HILDEBRAND et al., 2014), QIIME (CAPORASO et al., 2010a), Mothur (SCHLOSS et al., 2009), BMP (PYLRO et al., 2014) e MICCA (ALBANESE et al., 2015).

BioMas (*Bioinformatic Analysis of Metagenomic Amplicons*) é um servidor online que requer o registro e login do usuário. A versão para dados do Illumina também está disponível pela plataforma Galaxy. Aceita arquivos no formato *fastq* ou *sff* – respectivamente arquivos do Illumina e 454. O usuário apenas submete os dados e o processo de análise para rDNA 16S e ITS é automatizado, sendo que os resultados são enviados por e-mail (FOSSO et al., 2015).

RDP (*Ribosomal Database Project*), além do próprio banco de dados de DNA ribossomais, apresenta um amplo conjunto de ferramentas para análises de rRNA 16S. Apresenta um servidor online e, diferentemente do BioMas, o processamento dos *reads* não é automatizado em apenas uma submissão, ocorrendo por etapas. São aceitos arquivos nos formatos *fasta*, *fastq*, GenBank ou EMBL. Os resultados de cada etapa são salvos, permitindo ao usuário mudar entre as ferramentas. Além da versão online, há a versão em código aberto para execução local, que inclui a maioria das ferramentas disponíveis online. Neste caso, a execução é realizada por linhas de comando (COLE et al., 2014).

LotuS (*less operational taxonomic units scripts*) aceita *reads* dos sequenciadores 454 e Illumina, realizando análises de rDNA 16S. Requer instalação local e está disponível para os sistemas operacionais OS X (Mac) e Linux. A execução é realizada por meio de *scripts* em Perl e C++. A interface não é gráfica, sendo a execução realizada por meio de linhas de comando no terminal (HILDEBRAND et al., 2014). De forma semelhante, o QIIME e o Mothur requerem

a instalação local e a execução é realizada por linhas de comando, sem interface gráfica. Tanto o QIIME como o Mothur são os *pipelines* mais utilizados para análises de *targeted metagenomics*.

Plummer e colaboradores (2015) compararam a utilização dos *pipelines* Mothur e QIIME para a análise dos genes de rRNA 16S da microbiota do intestino de bebês prematuros. Os filos foram detectados em abundâncias similares, porém, o tempo para concluir a análise no QIIME é mais rápido do que no Mothur – enquanto o QIIME roda os dados em uma hora, o Mothur demora aproximadamente 10 horas. Os autores concluíram que ambos os *pipelines* produzem resultados da composição de amostras de alta confiabilidade e que diferenças a nível de gênero, são limitações advindas da análise dos genes de rRNA 16S, que podem apresentar sequências próximas uma das outras e quase indistinguíveis.

Grande parte dos *pipelines* é aplicável aos dados de sequenciamento 454 e Illumina. BMP (*Brazilian Microbiome Project*) e MICCA (*MICRobial Community Analysis*) são alguns dos *pipelines* que apresentam uma metodologia para a análise de rDNA 16S aplicável ao sequenciamento na plataforma do Ion Torrent.

Em adição aos índices de diversidade, a análise estatística é um componente importante para a avaliação da representatividade e significância da taxonomia e funcionalidade atribuída às sequências. Das ferramentas para análise estatística, o STAMP (*Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles*) é uma ferramenta que computa os cálculos estatísticos, permitindo comparar pares de amostras e dois ou mais grupos de tratamentos. O programa apresenta uma interface amigável e pode ser instalado nos sistemas operacionais Windows, Linux ou OS X. Permite a análise estatística a partir de dados do Mothur, MG-RAST (.tsv), arquivos em formato BIOM (PICRUSt ou QIIME), ou spf e pode gerar gráficos de PCA (Análise de Componente Principal), *Box Plot*, *Heatmap* e barra de erro estendido (PARKS et al., 2014).

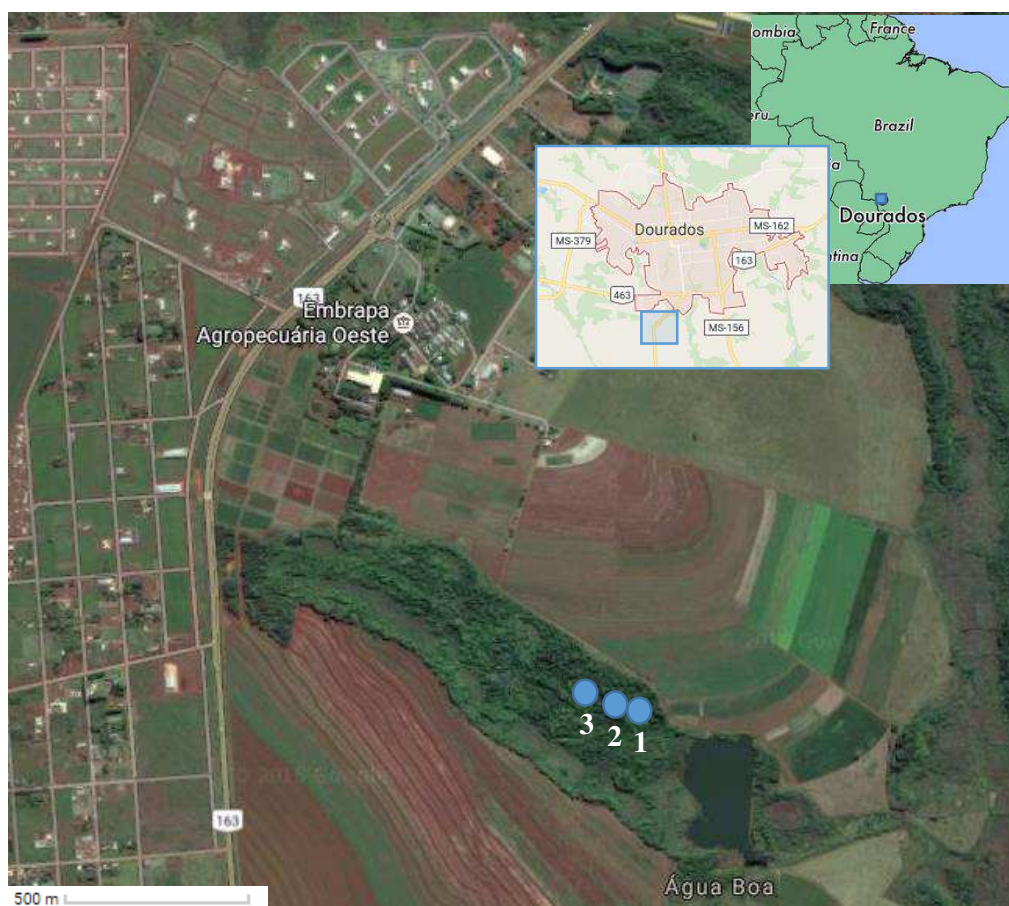
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material

O solo de floresta semidecidual foi coletado em três coordenadas na fazenda experimental da EMBRAPA Agropecuária Oeste, na região de Dourados - MS. As coordenadas da coleta foram (Figura 6):

- Ponto 1: 22°17'06.4"S 54°48'37.5"W;
- Ponto 2: 22°17'05.7"S 54°48'39.9"W;
- Ponto 3: 22°17'04.9"S 54°48'42.8"W.

Figura 6 – Coordenadas da coleta da amostra



Fonte: WorldAtlas e Google Maps (2016)

Para cada ponto, obtiveram-se solos em três níveis de profundidade: superfície do solo, aproximadamente 5 cm e 10 cm de profundidade da superfície. Todas as amostras de solo foram homogeneizadas e divididas em seis Erlenmeyers autoclavados, sendo três para a aplicação de fipronil (Regent 800) e três para controle. Adicionalmente, foi realizada a análise química das

amostras do solo coletado e homogeneizado no laboratório da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

4.2 Microcosmo das amostras de solo

O microcosmo foi preparado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 g de solo. No tempo zero, os solos em cada Erlenmeyer foram umedecidos com 6 mL de solução salina 0,9%. Durante o período entre as aplicações das soluções, os frascos foram mantidos a 30°C na estufa incubadora BOD sem agitação. Após uma semana, aplicou-se 3 mL de solução salina 0,9% em cada Erlenmeyer. No frasco de tratamento com fipronil, além da solução salina, aplicou-se fipronil diluído para uma concentração final de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ solo e esterilizado por autoclavagem (SILVA, 2000 adaptado). Nas semanas posteriores, aplicou-se 1 mL de solução salina 0,9%. As aplicações semanais de fipronil foram realizadas como na primeira semana em que esse defensivo agrícola foi aplicado. Após quatro semanas de aplicação de fipronil, prosseguiu-se a extração de DNA.

4.3 Amplificação e sequenciamento das regiões V4 e V5 do gene 16S

O DNA do microcosmo foi extraído utilizando-se o kit *Power Soil® DNA Isolation* do MoBio *Laboratories* de acordo com instruções do fabricante. A construção da biblioteca metagenômica de 16S e o sequenciamento dos *amplicons* das amostras de DNA foram realizados no Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala – LMSeq (Facility FAPESP proc. nº 2009/53984-2).

O DNA extraído foi quantificado pelo Qubit® 2.0 *Fluorometer* (Invitrogen-Life Technologies). Para a construção da biblioteca metagenômica, utilizaram-se *primers* para a amplificação por PCR das regiões V4 e V5 do gene de rRNA 16S. Os *primers* utilizados foram 515F (5'-TGTGNCAGCMGCCGCGTAA-3') e 926R (5'-barcode-CCCCGYCAATTYMTT-3') (QUINCE et al., 2011). Os *primers* para a amplificação estavam ligados aos adaptadores para sequenciamento, sendo que o *primer reverse* apresentava tanto o adaptador como o *barcode* para a identificação das sequências. As condições para a amplificação de 16S foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de três etapas: 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 45 segundos; e extensão final a 72°C por 5 minutos. Eletroforese em gel de agarose foi realizado para os *amplicons* utilizando-se *Gel Loading Dye Blue* (6X) da BioLab. As bandas formadas e correspondentes às

regiões V4 e V5 de 16S foram cortadas do gel para purificação do DNA. O DNA foi extraído com o kit Zymoclean™ *Gel DNA Recovery* (Zymo Research, The Epigenetics Company).

As sequências amplificadas foram quantificadas novamente pelo Qubit® *Fluorometer*. Verificou-se também o tamanho médio dos fragmentos utilizando o 2100 Bioanalyzer (Agilent). Os dados sobre a quantidade e o tamanho das sequências foram utilizados para a diluição e a preparação da emulsão das amostras.

Para a emulsão e o enriquecimento das amostras, utilizou-se o sistema Ion OneTouch™ 2 com o kit Ion PGM Hi-Q OT2 400. O DNA foi depositado em um chip Ion 318 V2 e o sequenciamento foi conduzido em um Ion-Torrent PGM (*Personal Genome Machine*) Hi-Q seguindo as instruções do fabricante.

4.4 Análise de dados

A análise metagenômica computacional foi realizada de acordo com o *pipeline* de 16S para Ion Torrent PGM do BMP (*Brazilian Microbiome Project*) (PYLRO et al., 2014) com adaptações. Paralelamente, foi realizada também a análise de acordo com o *pipeline* MICCA (*MICRobial Community Analysis*) (ALBANESE et al., 2015) com adaptações.

Para a etapa de pré-processamento de ambos os *pipelines*, os *reads* resultantes tiveram os contaminantes (primer e adaptadores) removidos por meio do programa FastX-Toolkit versão 0.0.14 (GORDON; HANNON, 2010). As sequências “limpas” foram unidas em um único arquivo em formato *fastq* com a devida identificação das amostras para cada sequência. O arquivo no formato *fastq* contém a identificação e as sequências dos *reads*, bem como a qualidade correspondente a cada base nucleotídica. As sequências foram filtradas por meio do programa Sickle versão 1.33 (JOSHI; FASS, 2011).

A maioria das tecnologias de sequenciamento produz *reads* na qual a qualidade das bases ao decorrer do comprimento vai deteriorando em direção ao final 3'. Dessa forma, alguns programas de filtragem dos *reads* realizam o corte (*truncation*) no final das sequências mais longas do que o tamanho definido pelo usuário a fim de eliminar nucleotídeos de baixa qualidade e que podem fornecer informações duvidosas. Entretanto, esse corte pode também eliminar nucleotídeos que fornecem informações importantes a respeito da sequência a ser analisada. Sickle é uma ferramenta que realiza a filtragem e o corte no final dos *reads* de acordo com a qualidade dos *reads*. Se ao decorrer do comprimento da sequência (posição de base na sequência), a qualidade média do *read* diminuir mais do que o limite estipulado e não aumentar após determinado número de bases, o programa determina onde a qualidade diminui no *read* e

onde realizar o corte, eliminando a região do *read* de baixa qualidade e evitando descartar bases de boa qualidade. Como parâmetro de corte, as sequências menores do que 150 pb foram descartadas e nucleotídeos na qual a qualidade média Phred do *read* se tornava menor do que Q23 foram cortadas.

Seguindo o *pipeline* BMP, as etapas seguintes foram realizadas por meio do programa USEARCH v.8 (EDGAR, 2010). As sequências foram derreplicadas. A sua abundância foi classificada do maior para o menor e *singletons* (OTUs representadas por apenas uma sequência única de DNA) encontrados foram descartados. Para caracterizar a estrutura taxonômica das amostras, as sequências foram agrupadas em OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) utilizando-se o método UPARSE (EDGAR, 2013) e considerando-se o padrão de 97% de identidade, que representa a definição comum para espécies de bactérias. Filtraram-se as quimeras das OTUs formadas pelo método UCHIME (EDGAR et al., 2011) utilizando-se como banco de dados de referência o arquivo rdp_gold.fa do RDP (*Ribosomal Database Project*) v. 9 (COLE et al., 2014) contendo 10.049 sequências de referência. As OTUs filtradas foram mapeadas ao arquivo inicial do pré-processamento (após a filtragem por qualidade e antes da derreplicação) pelo USEARCH considerando 97% de similaridade. Por meio do *script* disponibilizado pelo BMP, o arquivo resultante da etapa de mapeamento foi convertido para o formato de texto tabulado. Utilizou-se, em seguida, o *script* BIOM (MCDONALD et al., 2012a) para converter o arquivo de texto em formato BIOM (tabela de OTUs) e adicionar metadados a esse arquivo.

Para os passos seguintes do *pipeline* BMP, o programa QIIME foi utilizado (CAPORASO et al., 2010a). A taxonomia foi atribuída às OTUs formadas e filtradas utilizando-se os arquivos de taxonomia do Greengenes (MCDONALD et al., 2012b) (arquivos “rep_set/97_otus.fasta” e “taxonomy/97_otu_taxonomy.fasta”) como dados de referência. Para essa etapa, o QIIME utiliza como padrão o método UCLUST (EDGAR, 2010). O alinhamento global das OTUs filtradas foi realizado utilizando-se o núcleo de alinhamento de referência do Greengenes (DESANTIS et al., 2006) (arquivo “rep_set_aligned/97_otus.fasta”). Como padrão, o QIIME realiza o alinhamento pelo método do programa PyNAST (CAPORASO et al., 2010b). No alinhamento, os *reads*, variando de 150pb a 400pb, são alinhados contra sequências de genes de rDNA 16S inteiras e, conseqüentemente, ocorre a formação de diversos *gaps* (espaços que são inseridos no meio das sequências) devido às regiões nas sequências no rDNA 16S que não são alinhadas aos *reads*. A filtragem desses alinhamentos é importante para remover essas regiões que não fornecem informações. Assim, os alinhamentos foram filtrados. Uma árvore de referência foi construída a partir do alinhamento múltiplo com o conjunto de sequências

representativas de OTUs pelo programa FastTree (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2009) (padrão do QIIME). A partir da tabela BIOM e da árvore de referência, a curva de rarefação e o gráfico de PCoA (Análise de Coordenada Principal) foram executadas pelo QIIME utilizando-se o *script core_diversity_analyses.py* com o parâmetro *-e* definido de acordo com o valor mínimo de profundidade por amostra gerado pelo *script summarize-table* do BIOM. Índices de alfa-diversidade incluindo *Phylogeny Diversity whole tree*, índice de Shannon e índice de Simpson foram calculados por meio do *script alpha_diversity.py* do QIIME.

Seguindo a *pipeline* MICCA, utilizou-se o método de referência fechada (*closed reference*) para a seleção de OTUs. Nessa etapa, as sequências filtradas foram agrupadas em OTUs com base no banco de dados de referência do Greengenes (MCDONALD et al., 2012b) (arquivo “*rep_set/97_otus.fasta*”), quimeras foram filtradas e *reads* que não correspondiam a nenhuma sequência do banco de dados foram descartados. A taxonomia foi atribuída às OTUs agrupadas utilizando-se o classificador RDP v.2.12 (WANG et al., 2007). A tabela de OTUs gerada foi convertida para o formato BIOM. A fim de construir a árvore de referência, o alinhamento múltiplo das sequências foi realizado por meio do método NAST (*Nearest Alignment Space Termination*: Alinhamento de “término de espaço” mais próximo) utilizando como referência, o núcleo de sequências para alinhamento do Greengenes (DESANTIS et al., 2006). A distância UniFrac (utilizada para gerar o gráfico de PCoA) requer que árvores de referência tenham uma raiz. Assim, executou-se o *script micca root* que atribui a raiz como o ponto médio entre os dois pontos da árvore mais distantes. A árvore foi construída no formato Newick executando o *script micca tree*. As análises de diversidade (curva de rarefação, gráfico de PCoA (Análise de Coordenada Principal)) foram geradas pelo QIIME a partir da tabela BIOM e da árvore de referência utilizando-se o *script core_diversity_analyses.py* com o parâmetro *-e* definido de acordo com o valor da profundidade por amostra gerado pelo *script tablestats* do MICCA.

As tabelas BIOM geradas por ambos os *pipelines* foram convertidas para o formato de perfil do STAMP (extensão.spf: *STAMP Profile File*), por meio do *script biom_to_stamp.py* (LANGILLE, 2015), a fim de inferir a diferença estatística entre os tratamentos pelo programa STAMP (*Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles*) (PARKS et al., 2014). Para a análise entre os dois grupos de amostras (tratamento e controle), foi utilizado o teste t não paramétrico de White. O método de intervalo de confiança adotado foi DP: *bootstrap* de 0.95. Índices de alfa-diversidade incluindo *Phylogeny Diversity whole tree*, índice de Shannon e índice de Simpson foram calculados por meio do *script alpha_diversity.py* do QIIME.

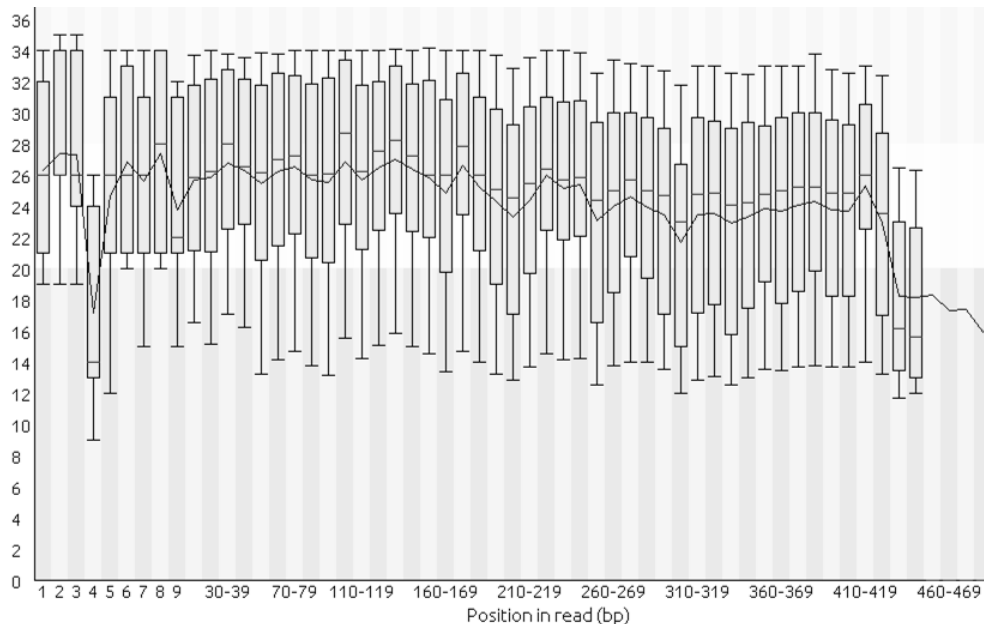
Para a predição funcional dos dados metagenômicos, a tabela de OTUs no formato de texto (extensão .txt) foi rarefeita com o valor mínimo de profundidade da amostra gerado pelo *script tablestats* do MICCA. A tabela de OTUs rarefeitos foi convertida para o formato BIOM. Em seguida, os valores de OTUs foram normalizados pelo programa PICRUSt (LANGILLE, 2015). A partir dessa normalização, procedeu-se a predição metagenômica funcional na qual cada valor de abundância normalizada de OTU foi multiplicado por cada valor de abundância da característica funcional predita para produzir uma tabela BIOM de funções (linhas) por amostras. Essa tabela foi convertida para o formato .spf por meio do script *biom_to_stamp.py* (LANGILLE, 2015) para análise estatística dos dados pelo STAMP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sequenciamento, a deposição das amostras no chip foi de 82% sendo que dessas, 45% das *beads* eram policlonais. No total, 321.561 *reads* brutos foram gerados do sequenciamento, sendo 119.553 *reads* do controle e 202.008 *reads* do tratamento com fipronil.

Tanto na etapa de filtragem proposto pelo *pipeline* BMP como MICCA, as seqüências passam pelo processo de *truncation*. No processo de *truncation*, a partir do parâmetro de comprimento de *reads* definido pelo usuário, seqüências menores do que esse parâmetro são descartadas e seqüências mais compridas são cortadas no nucleotídeo da posição do parâmetro definido. Por exemplo, se o parâmetro para o comprimento da seqüência for definido em 200pb, seqüências menores ou igual a 199pb são descartadas e seqüências mais compridas do que o parâmetro definido são cortadas na posição de 200º nucleotídeo. Esse processo possibilita padronizar o tamanho dos *reads* para um melhor alinhamento posterior (alinhamentos com seqüências de tamanhos similares apresentam melhores resultados uma vez que há menor número de inserção de *gaps*). Além disso, a etapa de *truncation* é utilizada como uma forma de eliminar nucleotídeos de baixa qualidade. Durante o sequenciamento, a qualidade das bases diminui à medida que se avança a posição no *read*, o que é demonstrado na figura 7.

Figura 7 – Distribuição da qualidade Q (Phred) das bases ao decorrer da posição nos *reads* brutos

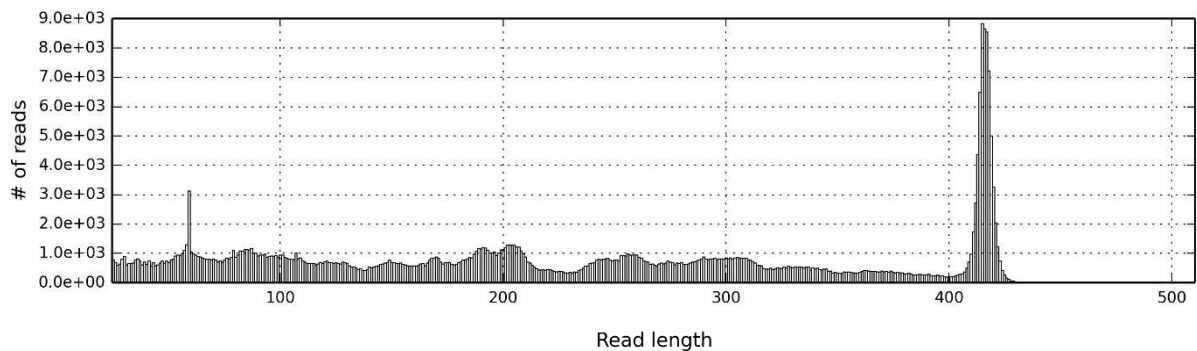


Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa FastQC (ANDREWS et al., 2010)

Gráficos da qualidade média por posição de nucleotídeo gerados a partir do arquivo fastq de seqüências brutas. Eixo X = Posição no *read*; Eixo Y = Qualidade Phred das bases. A linha contínua representa a média e os cortes horizontais nas barras representam a mediana. As barras representam a amplitude interquartil (25% - 75%).

Entretanto, não foi realizado o processo de *truncation* por diversos motivos. Primeiro, a maior parte dos comprimentos dos *reads* gerados neste trabalho foi em torno de 420pb (Figura 8) e, ao selecionar o parâmetro no padrão proposto pelo *pipeline* BMP (200pb), nucleotídeos que se encontram a partir da 200ª posição desses *reads* seriam descartados, independentemente se essas bases apresentam a qualidade alta. Conseqüentemente, muitas informações que esses nucleotídeos poderiam fornecer seriam desconsideradas. Segundo, mesmo se os *reads* fossem cortados com o parâmetro baseado nas sequências que apresentam a maior frequência de determinado tamanho, sequências menores – mesmo com diferença de um par de base – seriam descartadas, ocasionando a perda dessas sequências que poderiam fornecer informações importantes. Neste trabalho, por exemplo, a maioria das sequências apresenta comprimento de 420pb e se esse tamanho fosse utilizado como parâmetro, sequências menores ou iguais a 419pb seriam descartadas.

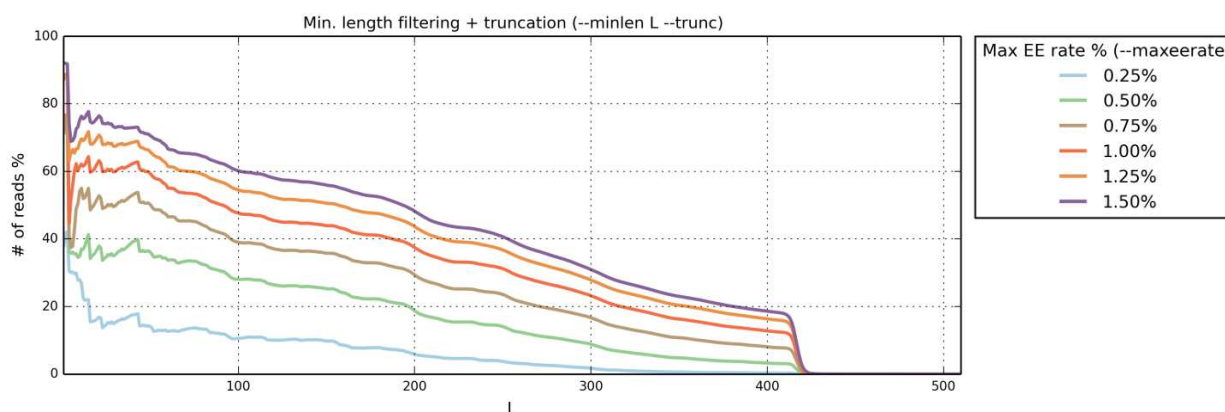
Figura 8 – Distribuição da frequência dos *reads* brutos por tamanho



Fonte: Elaborada pela autora por meio do script *stats* do MICCA (ALBANESE et al., 2015)

Além disso, a qualidade das bases diminui à medida que se avança a posição no *read* (Figura 7) e isso significa que quanto mais comprida a sequência, a qualidade média do *read* é menor. Portanto, quanto maior o comprimento da sequência configurado no parâmetro, um maior número de sequências seria descartado devido à qualidade média do *read*. Isso pode ser representado pelo gráfico (Figura 9) na qual o MICCA estima a porcentagem de *reads* que restaria dos dados brutos (após a filtragem) em função do comprimento de *truncation* a ser escolhido – e considerando a porcentagem de taxa de erro máximo (% max EE rate).

Figura 9 – Porcentagem de *reads* que restariam após a filtragem com corte



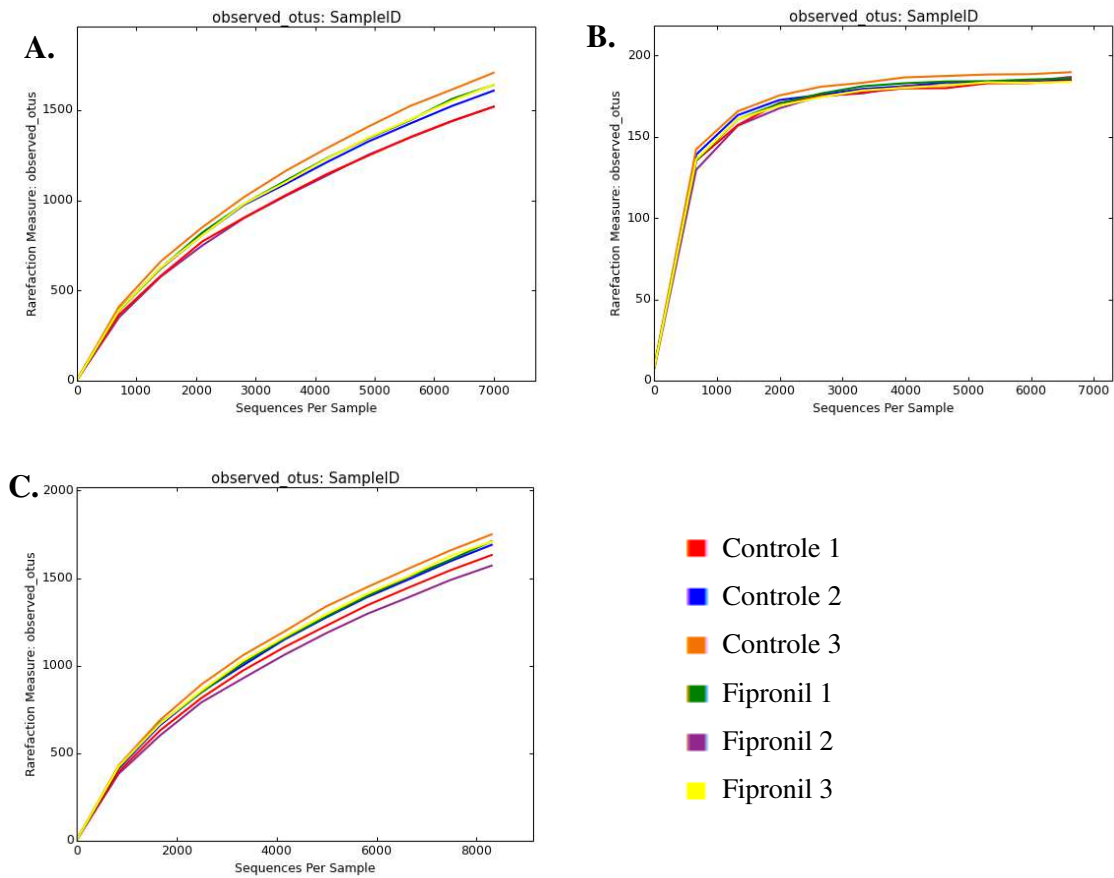
Fonte: Elaborada pela autora por meio do *script filterstats* do MICCA (ALBANESE et al., 2015).

Desse modo, a etapa de filtragem foi realizada por meio do programa Sickle v. 1.33 (JOSHI; FASS, 2011), uma vez que este determina onde a qualidade diminui no *read* e realiza o corte apropriado. Após a etapa de pré-processamento, na qual sequências de qualidade menor do que Q23 foram removidas, 94.416 sequências foram filtradas (29,36% do arquivo inicial) do total de *reads* brutos.

De acordo com a figura 7, uma súbita queda da qualidade das primeiras bases ocorreu, sendo recuperada nas bases posteriores. Whiteley e colaboradores (2012) realizaram o sequenciamento na plataforma Ion Torrent PGM e também verificaram a queda da qualidade nas primeiras bases tanto com o kit Ion Xpress Template 100 (para gerar *reads* de 100pb) como Ion Xpress Template 200 (*reads* de 200pb). Por ocorrer tanto nos dados das amostras deste trabalho como em dados de outras amostras utilizando dois diferentes kits de preparação para o sequenciamento no Ion Torrent PGM (WHITELEY et al., 2012), provavelmente a baixa qualidade nos primeiros nucleotídeos é um efeito inerente ao próprio sequenciamento Ion Torrent PGM.

Quanto à representatividade das amostras sobre o número de OTUs, o *pipeline* BMP apresentou visualmente uma cobertura suficiente, demonstrada pela inclinação quase plana horizontalmente, atingindo o platô (Figura 10b). Isso significaria que por mais que sejam adicionadas mais sequências às amostras, a contribuição dessa adição se tornaria pequena para o número de OTUs. Por outro lado, o *pipeline* MICCA apresentou uma inclinação mais íngreme, como se a quantidade de sequências não fosse o suficiente para representar o número de OTUs na amostra (Figura 10a).

Figura 10 – Curva de rarefação

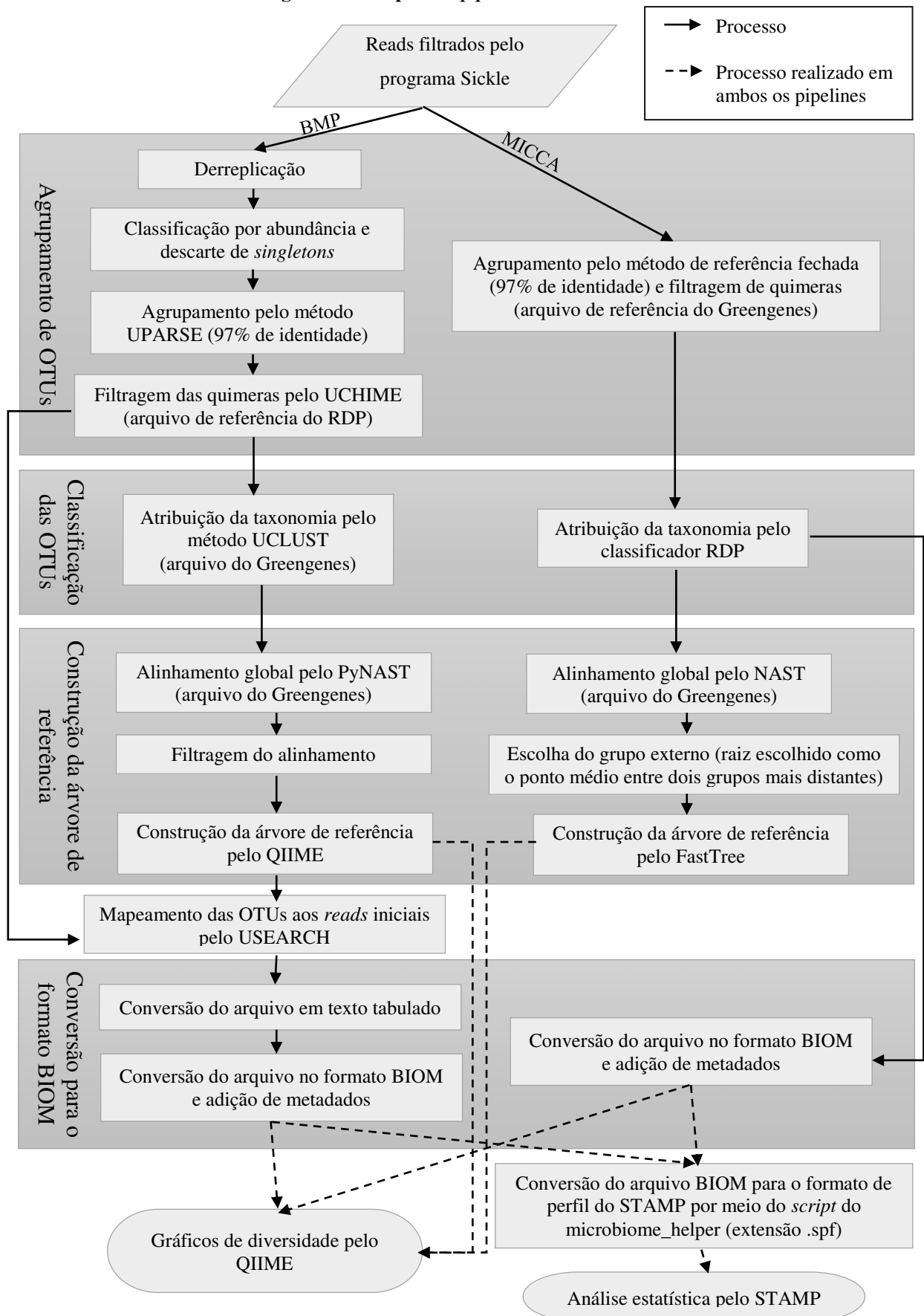


Fonte: Elaborada pela autora por meio do *script core_diversity_analyses.py* do QIIME (CAPORASO et al., 2010a)

A. Pipeline MICCA. **B.** Pipeline BMP. **C.** Pipeline BMP sem descartar singletons.

Essa diferença possivelmente pode ser explicada pelas etapas distintas entre ambos os *pipelines*. No BMP, sequências de *singletons* são descartadas na etapa de agrupamento de OTUs enquanto no MICCA, essas sequências são mantidas (Figura 11).

Figura 11 – Etapas dos *pipelines* BMP e MICCA



Fonte: Elaborada pela autora baseado nos *scripts* utilizados para cada *pipeline*

Após o agrupamento de OTUs, o número de OTUs no MICCA é maior (Tabela 1) uma vez que OTUs raras representadas por *singletons* são mantidas. No BMP, o número de OTUs diminui consideravelmente, pois apenas as OTUs comuns (de maior abundância) representadas por pelo menos duas sequências de DNA são mantidas. Ao manter os *singletons* no *pipeline* do BMP, a curva de rarefação apresentou a inclinação semelhante à do *pipeline* MICCA, confirmando essa hipótese (Figura 10c). Assim, quanto maior o número de diferentes OTUs mantidos após a etapa de agrupamento destas, maior o número de sequências que devem estar presentes em uma amostra para que a curva alcance uma diversidade estável.

Tabela 1 – Resumo de dados das OTUs

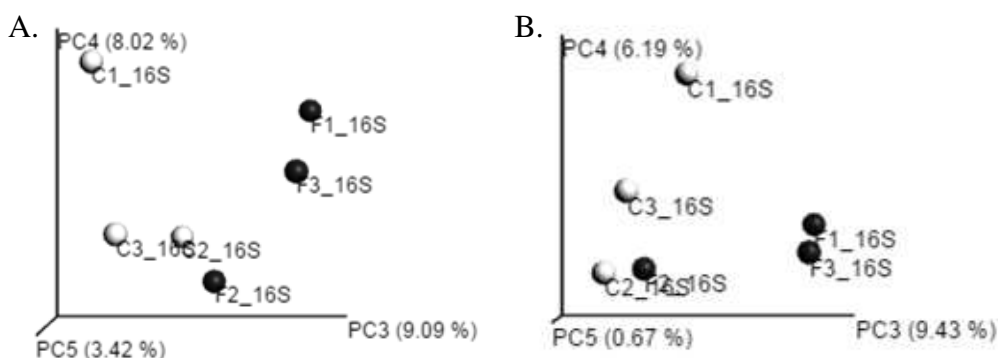
	MICCA	BMP
Nº de OTUs	4712	193
Nº total de sequências	69893	64979
Densidade da tabela (fração de valores não-zeros)	0,436	0,972

Fonte: Elaborada pela autora por meio do *script core_diversity_analyses.py* do QIIME (CAPORASO et al., 2010a)

Albanese e colaboradores (2015), compararam as análises metagenômicas de uma mesma amostra realizadas com o pipeline MICCA, UPARSE e QIIME. Similarmente, os autores demonstraram que o UPARSE resulta em um número menor de OTUs formados em comparação com o número de OTUs formados pelo MICCA. Esses resultados estão em consenso com os dados analisados pelo BMP e do MICCA, pois o BMP utiliza o UPARSE para o agrupamento de OTUs e este resultou em um número menor de OTUs em relação ao MICCA.

Quanto à análise de PCoA (Figura 12), em ambos os *pipelines*, as distâncias entre as amostras de Fipronil 1 (F1_16S) e Fipronil 3 (F3_16S) apresentaram-se mais próximas entre si em comparação com a distância entre a amostra de Fipronil 2 (F2_16S) e as demais amostras do mesmo tratamento. A amostra de Controle 1 (C1_16S) apresentou-se como a mais distante das amostras de controle. Possivelmente a distância envolvendo as amostras de Fipronil 2 e de Controle 1 em relação às demais amostras, pode estar relacionada tanto ao delineamento experimental (número de amostras por tratamento, tempo de microcosmo) quanto ao número de *reads* sequenciados que pode não ter sido suficiente.

Figura 12 – Análise de PCoA



Fonte: Elaborada pela autora por meio do *script core_diversity_analyses.py* do QIIME (CAPORASO et al., 2010a).

A. MICCA. B. BMP. C = Controle, representadas pelas esferas brancas. F = Fipronil, representadas pelas esferas pretas.

Devashree e colaboradores (2014) estudaram o efeito do fipronil sobre os microrganismos do solo e da rizosfera de *Camellia sinensis* (L.) O. kuntze durante o período de 65 dias. Por meio da contagem de UFCs (unidades formadoras de colônia) por grama de solo e por meio da atividade de desidrogenase e de fosfatase, eles verificaram que o fipronil causou uma inibição significativa da comunidade bacteriana (diminuição das UFCs) inicialmente, do 5° ao 35° dia após o início da aplicação de fipronil, tanto no solo não rizosférico como na rizosfera. Possivelmente, o fipronil selecionou bactérias resistentes ou tolerantes ao fipronil e, após 50 dias, ocorreu o crescimento dessas bactérias capazes de metabolizar o fipronil indicado pelo aumento no número de UFCs. Porém, Devashree e colaboradores não identificaram quais foram as bactérias que cresceram após 50 dias. Outros trabalhos sobre a degradação do fipronil têm demonstrado que os microrganismos aceleram a transformação do pesticida em outros metabólitos e, conseqüentemente, o período de degradação do pesticida, porém, o tempo de degradação do fipronil é muito variável e ainda não foi elucidado quais são todos os microrganismos envolvidos nesse processo (SILVA et al., 2016; YING, KOOKANA, 2002; MASUTTI, MERMUT, 2007).

Como as amostras utilizadas para o sequenciamento neste trabalho foram da aplicação de microcosmo após quatro semanas, há possibilidade de que os dados obtidos se referem ao período em que ocorreu a inibição da comunidade bacteriana susceptível ao fipronil. A fim de se obter uma maior diferença entre os tratamentos e avaliar melhor o efeito do fipronil sobre a comunidade bacteriana no solo, um período mais longo de aplicação do fipronil poderia ter sido requerido para que houvesse maior crescimento da comunidade capaz de metabolizar o

pesticida. Assim, o resultado do efeito do fipronil é válido para a avaliação da comunidade bacteriana nos primeiros 28 dias após o início da aplicação do fipronil.

Sobre os índices de alfa-diversidade – que medem a diversidade de táxon dentro das amostras –, o índice PD *Whole Tree* foi maior no *pipeline* MICCA para todas as amostras (Tabela 2). *Singletons* mantidos no *pipeline* MICCA podem ter contribuído para o valor desse índice, uma vez que pode haver a possibilidade de existirem OTUs raras distantes das demais OTUs. O índice de Shannon foi maior para o *pipeline* MICCA para todas as amostras. Provavelmente esses valores estão associados com o número de OTUs encontrados no MICCA devido aos *singletons* mantidos, enquanto no BMP estes são descartados.

Tabela 2 – Índices de alfa-diversidade

	PDWT MICCA	PDWT BMP	Shannon MICCA	Shannon BMP	Simpson MICCA	Simpson BMP	OTU MICCA	OTU BMP
C1_16S	137,68	9,06	8,7922	6,1988	0,9898	0,9693	1842	186
C2_16S	122,66	9,01	9,0829	6,4956	0,9935	0,9805	1608	185
C3_16S	137,23	9,32	9,3253	6,5744	0,9946	0,9820	1883	190
F1_16S	168,30	9,21	9,1848	6,3798	0,9922	0,9751	2524	189
F2_16S	159,91	9,25	8,6499	5,9095	0,9862	0,9505	2284	189
F3_16S	153,60	9,21	9,1480	6,4242	0,9922	0,9777	2192	186

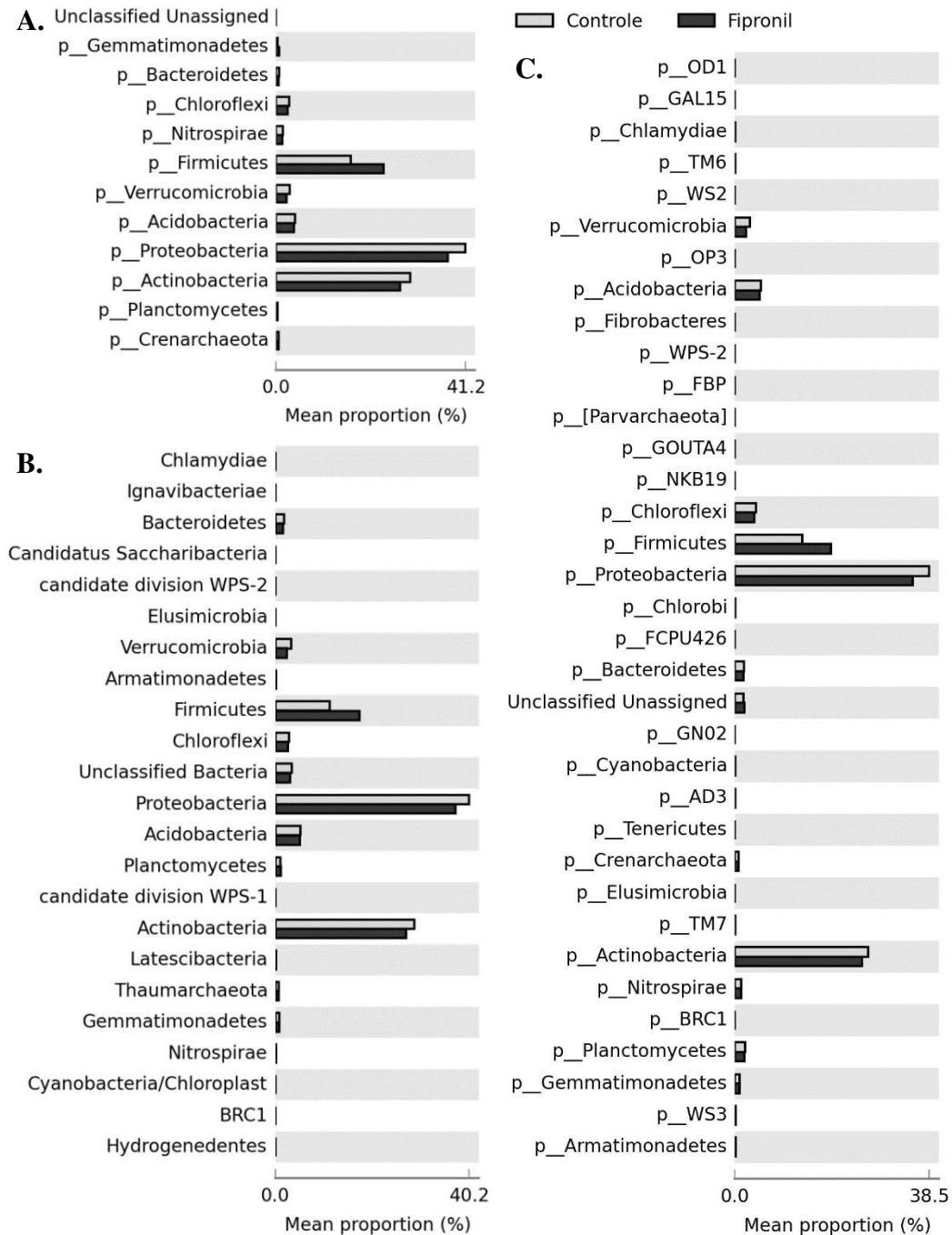
Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados processados pelo *script alpha_diversity.py* do QIIME

(CAPORASO et al., 2010a)

PDWT = Phylogenetic Diversity Whole Tree

Os valores do índice de Simpson maiores do que 95% em ambos os *pipelines* indicam que houve predominância (maior abundância) de um pequeno grupo de espécies em relação às demais. Esse resultado é visível na figura 13, onde os filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria foram dominantes em proporção média aos outros filos.

Figura 13 – Proporções médias dos filios entre os tratamentos



Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

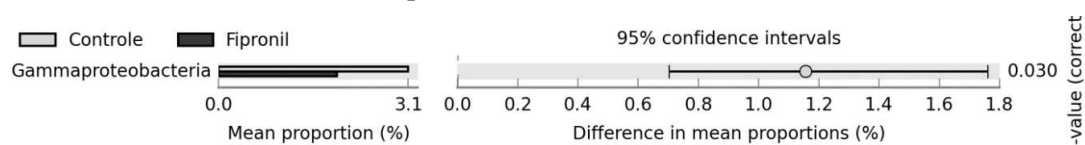
A. Gráfico gerado a partir do BMP. **B.** Gráfico gerado a partir do MICCA. **C.** Gráfico gerado a partir do BMP incluindo *singletons*

Mesmo que tenha sido apresentada a dominância por alguns grupos de bactérias (Figura 13), não houve diferenças estatisticamente significativas a nível de filo entre o controle e o tratamento com fipronil, considerando o p-value abaixo de 0,05. Apesar disso, o filo Firmicutes apresentou proporção maior para o tratamento com fipronil. Provavelmente as

diferenças a nível de filo teriam sido estatisticamente significativas se o microcosmo tivesse sido realizado por um maior período de tempo. Bactérias do filo Firmicutes são em sua maioria Gram-positivas com baixa porcentagem de GC no seu conteúdo nucléico. Apresenta ácido murâmico existente na parede celular rígida. Podem apresentar a forma de endósporos com resistência ao calor (SCHLEIFER, 2009). Foram reportadas na literatura diversas bactérias pertencentes ao filo Firmicutes capazes de metabolizar o fipronil (biodegradadores) e que podem participar da via de degradação desse pesticida. Entre esses microrganismos, foram relatadas as bactérias *Bacillus thuringiensis* (MANDAL et al., 2013) e *Bacillus firmus* (MANDAL et al., 2014).

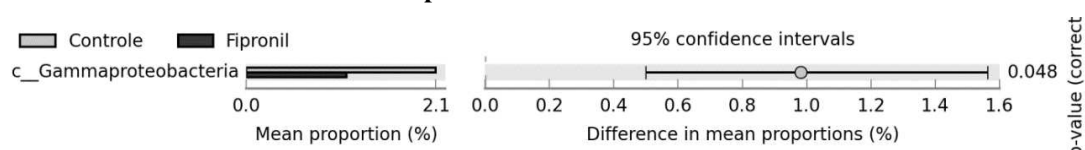
As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram significativas a partir do nível de classe. Tanto para os dados do BMP sem *singletons* e com *singletons* bem como do MICCA, a classe Gammaproteobacteria apresentou maior proporção significativa no controle (Figura 14, 15 e 16). No *pipeline* BMP considerando os *singletons*, as classes Chlamydia e GAL15 apresentaram-se estatisticamente significativas para o tratamento com fipronil.

Figura 14 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA



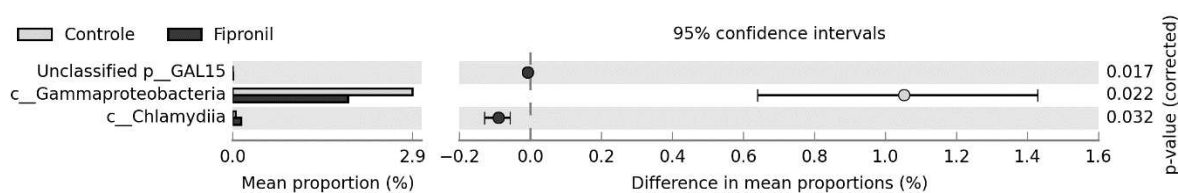
Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

Figura 15 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP



Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

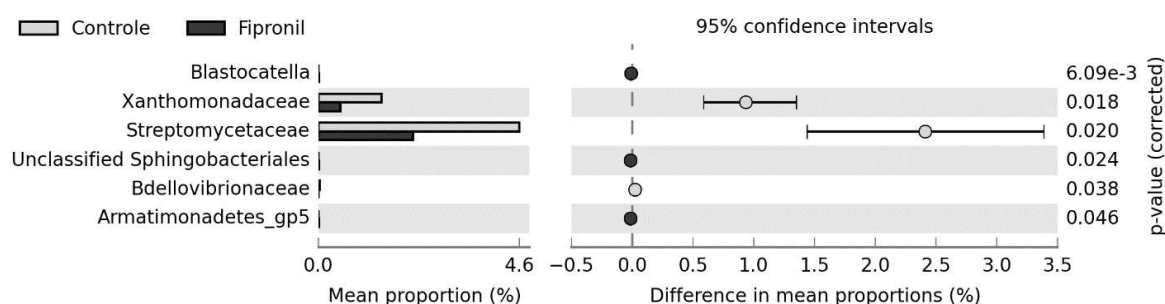
Figura 16 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando singletons



Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

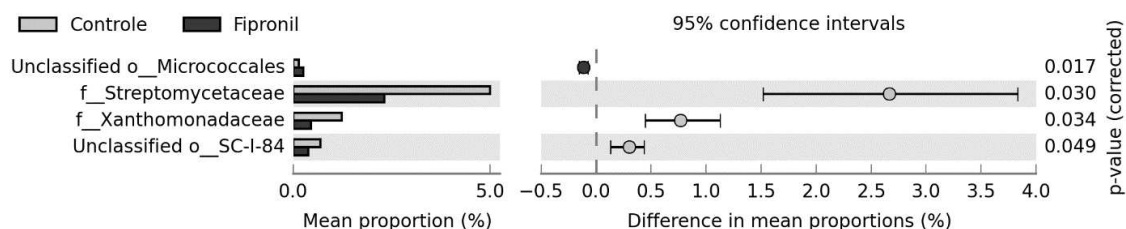
Dos *pipelines* BMP com e sem *singletons* e MICCA, Xanthomonadaceae e Streptomycetaceae foram as famílias que apresentaram maiores diferenças de proporções médias estatisticamente significativas (Figura 17, 18 e 19) para o controle, indicando a possibilidade de serem influenciadas negativamente pelo fipronil. Quanto às demais famílias que foram estatisticamente significativas para os tratamentos, não houve correspondência entre os *pipelines* MICCA e do BMP (considerando ou não os *singletons*). Provavelmente essa diferença pode ter sido decorrente da etapa de atribuição taxonômica distinta entre os *pipelines* (Figura 11). No BMP, a classificação taxonômica foi realizada pelo método UCLUST (EDGAR, 2010) baseado no banco de dados de referência para taxonomia do Greengenes (MCDONALD et al., 2012b), enquanto no MICCA, a atribuição taxonômica foi realizada pelo classificador RDP (WANG et al., 2007). A partir do BMP, uma família não classificada da ordem Micrococcales foi estatisticamente significativa em maior proporção para o tratamento com fipronil (Figuras 18 e 19).

Figura 17 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA



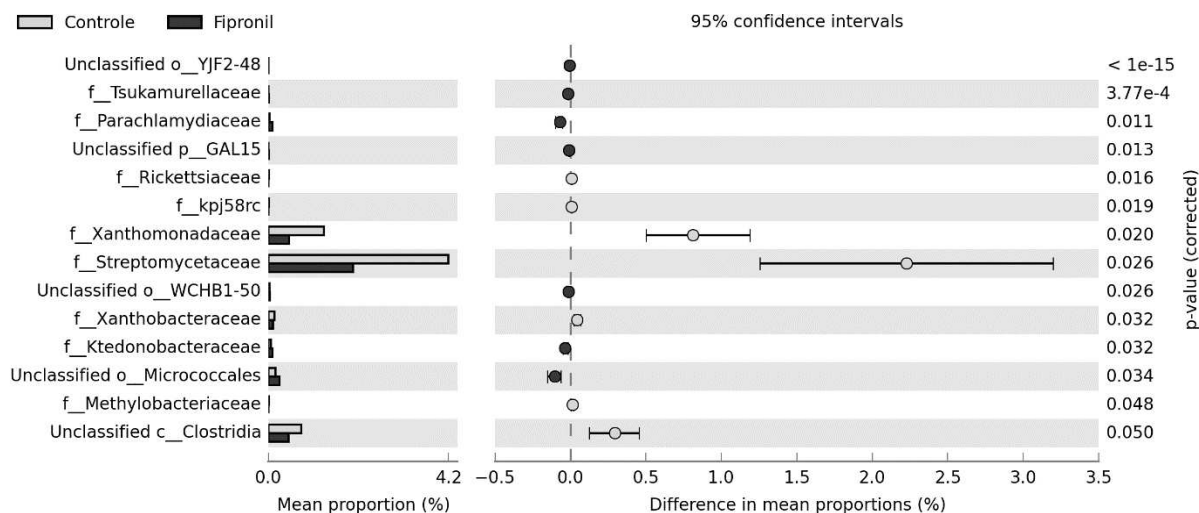
Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

Figura 18 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP



Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

Figura 19 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando *singletons*



Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

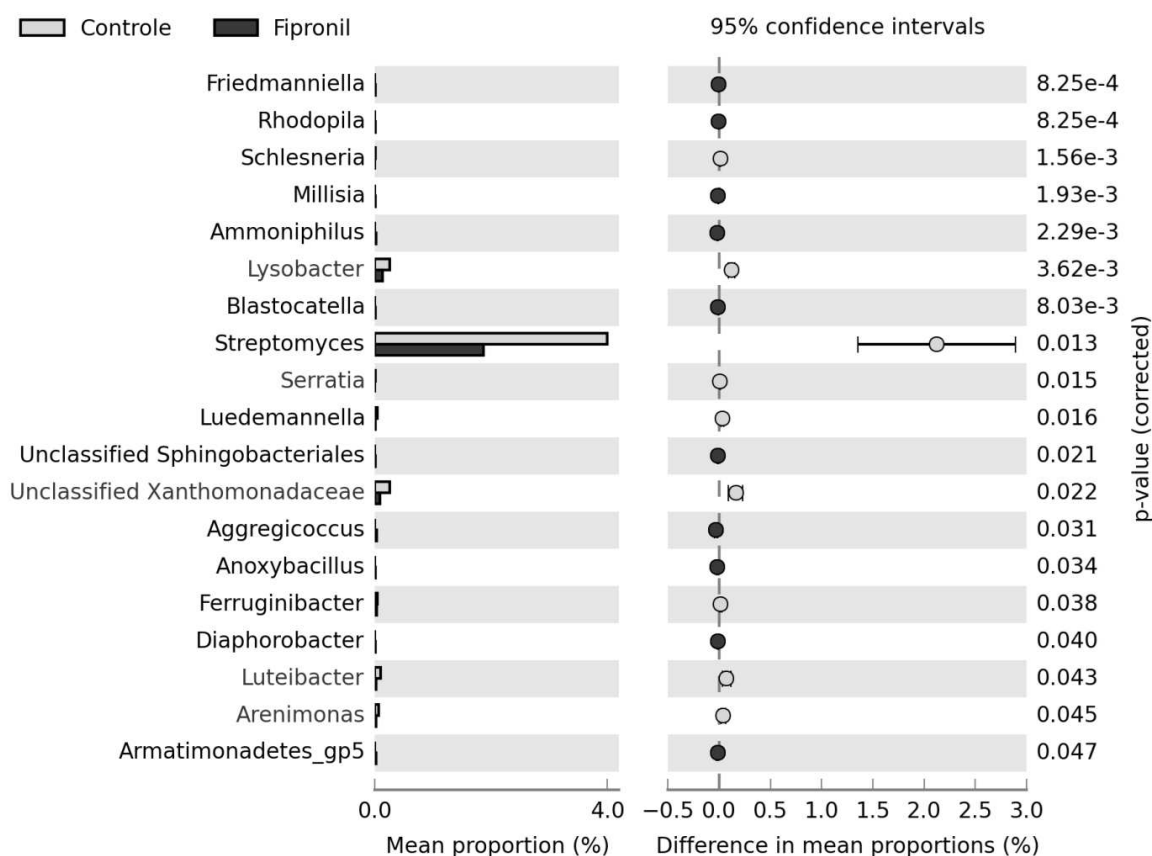
Não há uma descrição definida e detalhada sobre as características gerais das bactérias da ordem Micrococcales. Sabe-se que a assinatura padrão do rRNA 16S dessa ordem são (A–U) nas posições 127 a 234pb, (U–A) de 598 a 642pb, (U–A) de 657 a 749pb, (G–C) de 953 a 1228pb, (A) na posição 1362pb (GOODFELLOW et al., 2012). Essa ordem contém bactérias que são capazes de degradar defensivos agrícolas como a bactéria *Arthrobacter aureescens* que participa da via de degradação da atrazina (GAO, ELLIS, WACKETT, 2009). Bactérias da família Xanthomonadaceae pertencem à classe Gammaproteobacteria que contém bactérias Gram-negativas, sendo encontrada como uma classe predominante no Brasil (ROESCH et al., 2007). Apresentam o formato de bastonetes retos. Por enquanto, foram reportadas 23 gêneros dessa família com publicação validada. O gênero mais conhecido dessa família é o *Xanthomonas*. A maioria das espécies *Xanthomonas* produz um heteropolissacarídeo extracelular ácido característico denominado xantana, o que confere às colônias uma consistência viscosa (SADDLER, BRADBURY, 2005).

Bactérias da família Streptomycetaceae são aeróbicas, Gram-positivas, filamentosas e apresentam micélios vegetativos. Pertencentes à classe Actinobacteria, são os principais componentes das populações microbianas em solos (KÄMPFER, 2006). Podem crescer em diferentes condições de pH e podem estar envolvidos na degradação de diversos polímeros presentes na matéria orgânica (GLAESER; KÄMPFER, 2007). De acordo com o banco de dados LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) (EUZÉBY; PARTE, 2015), até o momento presente, a família Streptomycetaceae apresenta dez gêneros com

publicação validada no *Approved Lists of Bacterial Names (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology)*, sendo *Streptomyces* o gênero mais conhecido e com o maior número de espécies.

A nível de gênero, o MICCA apresentou diferença entre os tratamentos para um maior número de gêneros comparado ao BMP, porém, em proporções médias menores do que 2%, exceto para *Streptomyces* (Figura 20). A maior quantidade de gêneros no MICCA provavelmente é resultante da presença de OTUs raras (*singletons*), o que aumenta a sua riqueza (número). Ainda sobre os dados do MICCA, dez gêneros tiveram o crescimento influenciado positivamente pelo fipronil enquanto nove foram influenciados negativamente (Figura 20).

Figura 20 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA

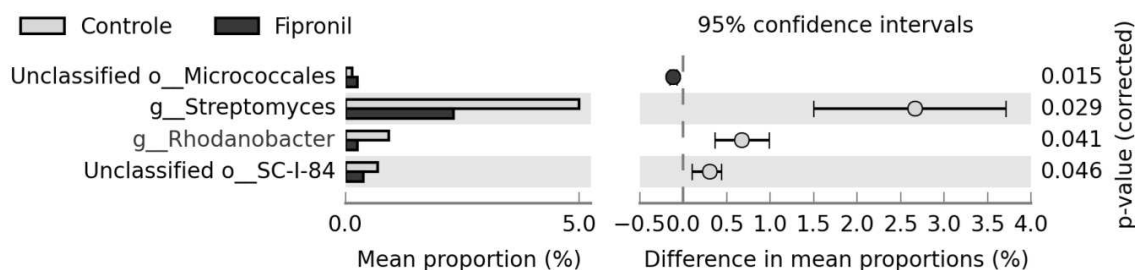


Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

O BMP padrão (sem *singletons*) apresentou diferença para apenas quatro gêneros com proporções maiores do que apresentados no MICCA (Figura 21). Considerando *singletons*, o BMP apresentou 16 gêneros a mais do que o *pipeline* padrão (Figura 22). Ambos os pipelines (incluindo BMP com e sem *singletons*) apresentaram maior proporção de *Streptomyces* no

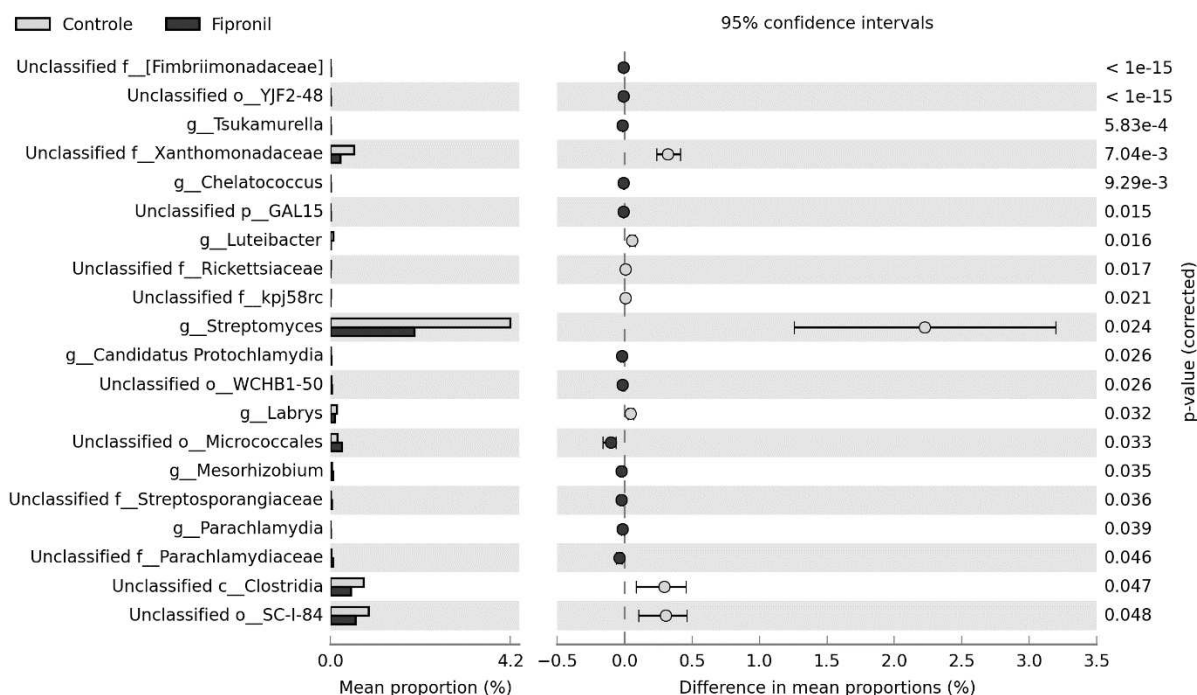
controle, indicando que o fipronil pode possivelmente alterar a presença desse grupo de bactérias no solo.

Figura 21 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP



Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

Figura 22 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando *singletons*



Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

Bactérias do gênero *Streptomyces* são Gram-positivas filamentosas com alto conteúdo de GC (66% a 78%), e a maioria das espécies produzem esporos. A maioria das espécies apresentam crescimento ótimo em pH neutro, embora tenham sido reportadas espécies acidofílicas em ambientes de baixo valor de pH (GOODFELLOW et al., 2012). Possuem papel importante na degradação da matéria orgânica, podendo ser associadas à decomposição de

lignocelulose (CRAWFORD, 1978), celulose (BUDIHAL; AGSAR; PATIL, 2016) e à hidrólise de amido (WILLIAMS; FLOWERS; 1977). Grande parte dos antibióticos são derivados de *Streptomyces* e diversos metabólitos com atividades antimicrobianas têm sido reportados (THAKUR et al., 2007). Efeitos do fipronil sobre *Streptomyces* ainda não foram reportados. Foi demonstrada apenas a inibição da biossíntese da parede celular de bactérias Gram-positivas por uma molécula derivada de 2-fenil-5,6-dihidro-2H-tieno[3,2-c]pirazol-3-ol (LI et al., 2003). Essa molécula apresenta a composição química semelhante ao fipronil, apresentando em sua constituição os grupos químicos fenil e pirazol.

Os gêneros pertencentes à família Xanthomonadaceae que apresentaram diferença estatística na proporção média foi o gênero *Rhodanobacter* para o BMP, enquanto para o MICCA (apesar da diferença na proporção média ser menor do que 1%), foram *Lysobacter*, *Luteibacter*, *Arenimonas* e um gênero não classificado de Xanthomonadaceae. Todos os gêneros dessa família apresentaram diferença para o controle.

Bactérias do gênero *Rhodanobacter* apresentam formas de bastonetes e são conhecidas por serem denitrificantes, contendo genes envolvidos no metabolismo do nitrato ao do nitrogênio gasoso (KOSTKA et al., 2012). Apresentam tolerância a condições ácidas. Em alguns ambientes ácidos e ricos em nitrato, espécies de *Rhodanobacter* foram dominantes em comunidades bacterianas (VAN DEN HEUVEL et al., 2010; GREEN et al., 2012).

De acordo com o banco de dados LPSN, a classificação do gênero *Lysobacter* dentro da família Xanthomonadaceae não segue as regras do Código Bacteriológico (*Bacteriological Code*) utilizadas para classificação taxonômica. Mesmo assim, bactérias pertencentes à esse gênero apresentam formas cilíndricas e delgadas, podendo existir células mais compridas do que outras. Várias espécies de *Lysobacter* produzem uma ampla variedade de enzimas extracelulares e metabólitos com atividades contra bactérias, fungos, oomicetos e nematoides (REICHENBACH, 2006). As enzimas identificadas incluem quitinases, glucanases, peptidase (DE BRUIJN, 2015; GÖKÇEN; VILCINSKAS; WIESNER, 2014), fosfatases, endonucleases, endoamilases, esterases, queratinases e elastases (REICHENBACH, 2006). Já os compostos antimicrobianos incluem lisobactina, tripopeptina, xantobaccina, maltofilina, dihidromaltofilina, fenazina e lactivicina (XIE et al., 2012). Devido às atividades contra uma ampla gama de patógenos, *Lysobacter* torna-se uma fonte importante para a bioprospecção de novas enzimas e compostos antimicrobianos.

Luteibacter consiste em um gênero de bactéria, com formato de bastão e que não forma esporos, isolado da rizosfera da cevada (*Hordeum vulgare* L.) (JOHANSEN et al., 2005). Não há muitas informações sobre seu papel na comunidade bacteriana, sendo apenas descrita como

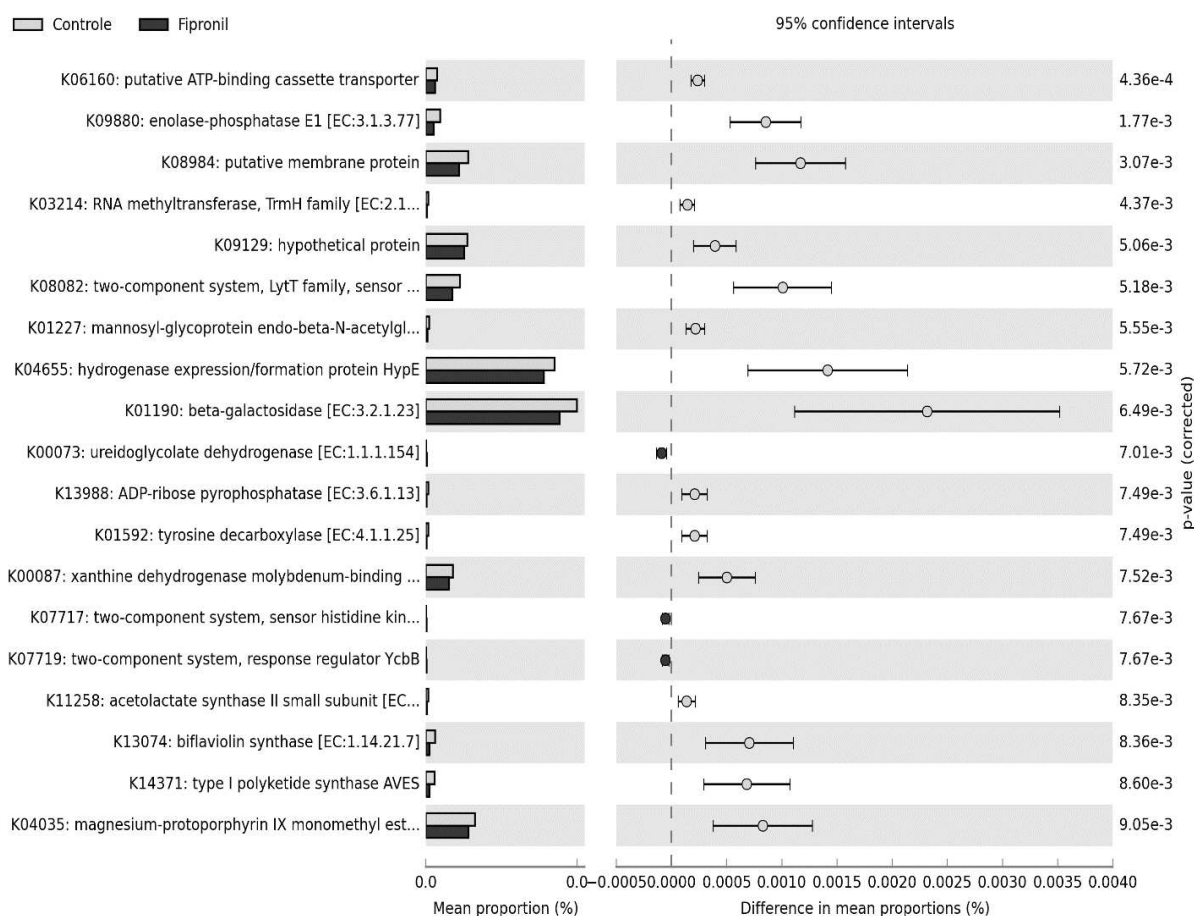
produtora de lipases extracelulares (BRESCIANI et al., 2014). Uma das espécies (*Luteibacter rhizovicinus* MIMR) foi caracterizada por promover o desenvolvimento de raízes de plantas, sendo candidata a biofertilizante (GUGLIELMETTI et al., 2013).

Arenimonas é um gênero isolado e identificado pela primeira vez de amostras da areia da costa litorânea (KWON et al., 2007). Bactérias desse gênero são caracterizadas por serem aeróbicas e bastonetes não formadoras de esporos. Não há muitas informações sobre o seu papel funcional no ecossistema.

Sobre a predição funcional a partir do gene rRNA 16S, considerando o *p-value* de 0,1000, ambos os pipelines predizeram em sua maioria enzimas com maior diferença na proporção média para controle (Figura 23 e 24). Nenhuma enzima foi predita em comum para ambos os pipelines.

A partir do pipeline MICCA, a enzima beta-galactosidase (K01190; EC 3.2.1.23) foi predita com maior proporção média pelo STAMP, seguida da proteína hypE para formação e expressão da hidrogenase (K04655) (Figura 23). A beta-galactosidase é uma enzima tetrâmera com quatro cadeias polipeptídicas idênticas e participa do metabolismo de carboidratos. A sua atividade enzimática envolve a hidrólise da lactose dissacarídica em galactose e glucose. Pode também catalisar a transgalactosilação da lactose em alolactose e ainda, hidrolisar a alolactose em monossacarídeos (JUERS; MATTHEWS; HUBER, 2012). A principal aplicação da beta-galactosidase está relacionada à indústria de alimentos para remoção da lactose em produtos para pessoas com tolerância à lactose e a produção de alimentos laticínios com melhor solubilidade, sabor e digestibilidade (HUSAIN, 2010). A proteína hypE possui um importante papel no operon hyp e participa da incorporação do níquel na apoproteína hidrogenase e na formação das subunidades constituintes da enzima hidrogenase (JACOBI; ROSSMANN; BÖCK, 1992). Diversos microrganismos são capazes de utilizar o hidrogênio molecular como fonte de energia por meio das enzimas hidrogenases. A habilidade em utilizar o hidrogênio molecular apresenta uma possibilidade do metabolismo do microrganismo ser independente do carbono orgânico e do oxigênio molecular, produtos da fotossíntese. Comunidades de organismos que apresentam metabolismo independente da fotossíntese são de grande interesse para estudos sobre ambientes onde não ocorre a fotossíntese, bem como sobre a vida primitiva da Terra (onde a atmosfera era rica em hidrogênio), sobre organismos que vivem na região mais profunda de oceanos ou sobre a existência de vida em outros planetas (VIGNAIS; BILLOUD, 2007).

Figura 23 – Proporção média de proteínas preditas e diferença na média de proporções entre os tratamentos a partir de dados do MICCA

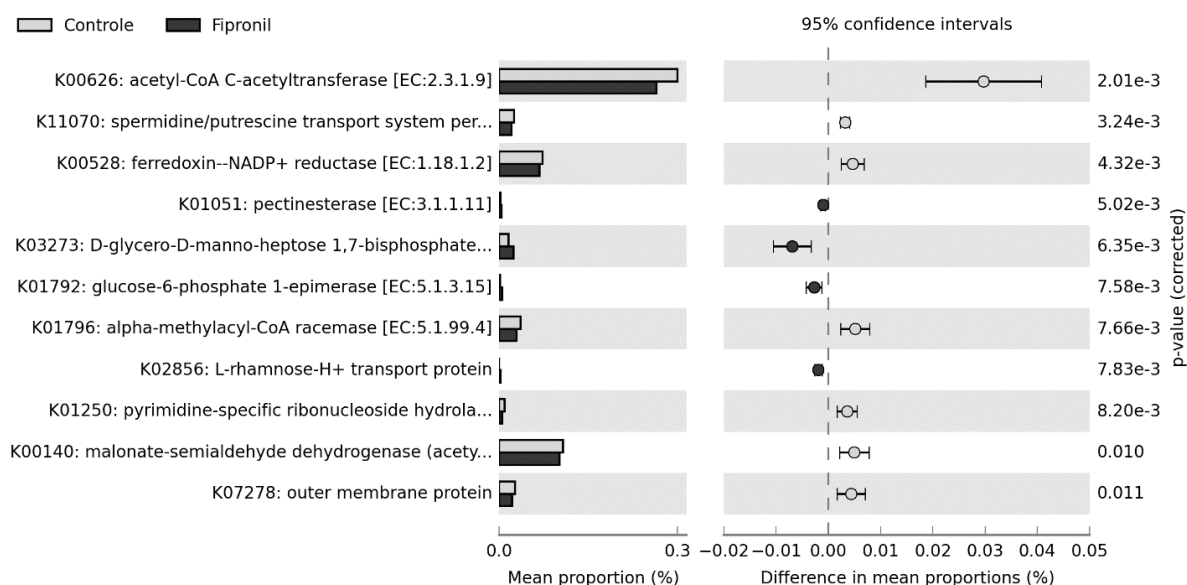


Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

Do *pipeline* BMP, a enzima predita que apresentou maior diferença na proporção média para o controle foi a acetil-CoA C-acetiltransferase (K00626; EC 2.3.1.9), seguida do malonato-semialdeído desidrogenase (K00140; EC 1.2.1.27) (Figura 24). A enzima malonato-semialdeído desidrogenase catalisa a oxidação do malonato semialdeído e do metilmalonato semialdeído, a fim de produzir respectivamente acetil-CoA and propionil-CoA (TALFOURNIER; STINES-CHAUMEIL; BRANLANT, 2011). Por sua vez, a enzima acetil-CoA C-acetiltransferase, também denominada tiolase II ou acetoacetil-CoA tiolase, catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA para acetoacetil-CoA e CoA, catalisando a primeira etapa da síntese de polihidroxitirato (PHB) (KOCHARIN et al., 2012; FOX et al., 2014). O polímero PHB têm sido estudado como alternativa potencial para a constituição de termoplásticos e de materiais biodegradáveis (SOMLEVA; PEOPLES; SNELL, 2013). Assim, ambas as enzimas preditas apresentam atividades relacionadas ao acetil-CoA. O acetil-CoA é um precursor essencial para a síntese de polihidroxitirato (PHB), polímero produzido pelas

bactérias em condições de estresse abiótica e que serve como fonte de carbono e energia (KOCHARIN et al., 2012). Ao contrário do fipronil, que serviu como fonte de carbono e nitrogênio, as condições do controle podem ter causado uma situação de estresse abiótica, – especificadamente, o meio apresentou falta de nutrientes como o nitrogênio e excesso de carbono devido à matéria orgânica existente no solo. Essas condições poderiam ter propiciado o crescimento de microrganismos que produzam essas enzimas. Desse modo, foram previstas enzimas relacionadas à catalisação de acetyl-CoA a partir de microrganismos produtores dessas enzimas. Entretanto, não se pode afirmar com certeza que essas enzimas foram produzidas durante o microcosmo pois testes bioquímicos seriam requeridos para validar a sua existência.

Figura 24 – Proporção média de proteínas previstas e diferença na média de proporções entre os tratamentos a partir de dados do BMP



Fonte: Elaborada pela autora por meio do programa STAMP (PARKS et al., 2014)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metagenômica a partir do gene 16S do RNA ribossomal possibilitou a análise do efeito do fipronil sobre a comunidade bacteriana durante o período de 28 dias após o início da sua aplicação.

A proporção média do filo Firmicutes foi maior para o tratamento com fipronil, indicando a probabilidade de haver bactérias desse filo com papel importante na via de biodegradação do fipronil. Apesar de não terem sido apresentadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos a nível de filo, essa diferença poderia ter sido detectada se um período maior de microcosmo tivesse sido realizada – de modo a conceder maior tempo de crescimento aos microrganismos tolerantes ou capazes de metabolizar o fipronil.

Os *pipelines* BMP e MICCA apresentaram resultados estatisticamente significativos e similares (em consenso) a nível de ordem, porém, diferentes a nível de gênero. Uma das principais diferenças entre os *pipelines* é a etapa de agrupamento de OTUs, na qual ocorre o descarte de *singletons* no BMP, enquanto no MICCA, *singletons* são considerados. Assim, sugere-se a utilização do BMP para a análise a nível de gênero das taxonomias bacterianas mais comuns e abundantes e quando se busca um nível de confiabilidade muito alto e a utilização do MICCA para a análise da diversidade considerando-se gêneros e espécies raros – uma vez que *singletons* são sequências candidatas a serem referentes a um grupo raro de indivíduos.

O gênero que apresentou maior diferença de proporção média entre os tratamentos foi *Streptomyces*. A proporção média desse gênero foi maior para o controle e isso indicaria que possivelmente esse grupo de bactérias seria susceptível ou com crescimento inibido pelo fipronil. Entretanto, ainda não foi reportado na literatura o efeito do fipronil sobre *Streptomyces*. Assim, este trabalho pode ser considerado como um passo inicial para a análise metagenômica mais aprofundada do efeito do fipronil sobre a comunidade bacteriana de solos.

A predição funcional a partir do gene 16S do RNA ribossomal é uma ferramenta que possibilitou prever as possíveis enzimas existentes e atuantes na comunidade bacteriana do solo, porém, estudos experimentais são necessários para a sua confirmação no microcosmo. A predição realizada indicou proteínas diferentes para cada pipeline, sendo que não foram apresentadas enzimas em comum. No *pipeline* MICCA, a enzima beta-galactosidase (K01190; EC 3.2.1.23) predita foi a que apresentou maior diferença de proporção média para controle, enquanto no *pipeline* BMP, a enzima predita que apresentou maior diferença para o controle na proporção média foi a acetil-CoA C-acetiltransferase (K00626; EC 2.3.1.9).

REFERÊNCIAS

- ALBANESE, D. et al. MICCA: a complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. **Scientific reports**, v. 5, p. 9743, 2015.
- ANDERSON, T. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1, p. 285-293, 2003.
- ANDREWS, S. et al. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. **Reference Source**, 2010.
- ANVISA. F43 Fipronil. In: ANVISA. **Monografias Autorizadas**. Regulamento técnico de 16 de março de 2016. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/i>> Acesso em: 16 abr. 2016.
- ASARO, C.; CREIGHTON, J. Use of systemic fipronil and imidacloprid to control regeneration pests of loblolly pine. **Journal of economic entomology**, v. 104, n. 4, p. 1272-1279, 2011.
- BACCI, G. et al. StreamingTrim 1.0: a Java software for dynamic trimming of 16S rRNA sequence data from metagenetic studies. **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 2, p. 426-434, 2014.
- BELLEMAIN, E. et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.
- BERNARDI, A. C. de C. et al. Correção do solo e adubação no sistema de plantio direto nos cerrados. Embrapa Solos, 2003.
- BLOOMQUIST, J. R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 54, n. 4, p. 145-156, 2003.
- BONMATIN, J. M. et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35-67, 2015.
- BRENNER, D. J. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Vol. 2. The proteobacteria. NY: Springer, 2005.
- BRESCIANI, F. R. et al. Production and activity of extracellular lipase from *Luteibacter* sp. **Annals of microbiology**, v. 64, n. 1, p. 251-258, 2014.
- BUDIHAL, S. R.; AGSAR, D.; PATIL, S. R. Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. **Bioresource technology**, v. 200, p. 706-712, 2016.
- CABALLERO, M. V. et al. Fipronil induces CYP isoforms in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 215-221, 2015.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010a.
- CAPORASO, J. G. et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2010b.

CID, Y. P. et al. Injectable fipronil for cattle: Plasma disposition and efficacy against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 4-8, 2016.

CHAGURI, J. L. et al. Exposure to fipronil elevates systolic blood pressure and disturbs related biomarkers in plasma of rats. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 42, p. 63-68, 2016.

CHUN, J. et al. The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D633-D642, 2014.

COUGHLAN, L. M. et al. Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

CRAWFORD, D. L. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1041-1045, 1978.

DE BRUIJN, I. et al. Comparative genomics and metabolic profiling of the genus *Lysobacter*. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 991, 2015.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DEVASHREE, Y. et al. The effect of Paraquat and Fipronil on the soil and rhizosphere microflora of tea (*Camellia sinensis* (L) O. kuntze). **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 7, n. 4, p. 1534, 2014.

DISTLER, J. et al. Streptomycin biosynthesis and its regulation in Streptomycetes. **Gene**, v. 115, n. 1, p. 105-111, 1992.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature methods**, v. 10, n. 10, p. 996-998, 2013.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. **Science**, v. 320, n. 5879, p. 1034-1039, 2008.

FERREIRA, M. **Estudo morfológico do fígado de camundongos expostos à ação do fipronil (Ingrediente ativo do acaricida Frontline®)**. 2010. 37 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

FERRER, M. et al. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 22-34, 2016.

FETTIG, C. J. et al. Efficacy of fipronil for protecting individual pines from mortality attributed to attack by western pine beetle and mountain pine beetle (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). **Journal of Entomological Science**, v. 45, n. 3, p. 296-301, 2010.

FOSSO, B. et al. BioMaS: a modular pipeline for Bioinformatic analysis of Metagenomic AmpliconS. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.

FOX, A. R. et al. Understanding the function of bacterial and eukaryotic thiolases II by integrating evolutionary and functional approaches. **Gene**, v. 533, n. 1, p. 5-10, 2014.

FUJIMOTO, M. et al. Application of ion torrent sequencing to the assessment of the effect of alkali ballast water treatment on microbial community diversity. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107534, 2014.

GANDRA, L. C. et al. Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. **Pest management science**, 2016.

GAO, Junfeng; ELLIS, Lynda BM; WACKETT, Lawrence P. The University of Minnesota biocatalysis/biodegradation database: improving public access. **Nucleic acids research**, p. gkp771, 2009.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 103-118, 2015.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Streptomycetaceae: phylogeny, ecology and pathogenicity. **eLS**, 2007.

GLASS, E. M.; MEYER, F. Analysis of Metagenomics Data. Capítulo 13. In: RODRÍGUEZ-EZPELETA, N.; HACKENBERG, M.; ARANSAY, A. M. (ed.) **Bioinformatics for High Throughput Sequencing**. p. 219-227. Springer Science+Business Media, LCC: Nova York, 2012.

GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 5, p. 759-769, 2011.

GOECKS, J.; NEKRUTENKO, A.; TAYLOR, J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome biology**, v. 11, n. 8, p. 1, 2010.

GÖKÇEN, A.; VILCINSKAS, A.; WIESNER, J. Biofilm-degrading enzymes from *Lysobacter gummosus*. **Virulence**, v. 5, n. 3, p. 378-387, 2014.

GOODFELLOW, M. et al. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Vol. 5. The Actinobacteria, Part A. Springer New York, 2012.

GORDON, A.; HANNON, G. J. Fastx-toolkit. **FASTQ/A short-reads preprocessing tools** (não publicado). 2010. Disponível em: <http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit>. Acesso em: 20 set. 2016.

GOTTEL, N. R. et al. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5934-5944, 2011.

GREEN, S. J. et al. Denitrifying bacteria from the genus *Rhodanobacter* dominate bacterial communities in the highly contaminated subsurface of a nuclear legacy waste site. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1039-1047, 2012.

GUELF, M. et al. Citotoxicity of Fipronil on Hepatocytes Isolated from Rat and Effects of Its Biotransformation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p. 843-853, 2015.

GUGLIEMETTI, S. et al. *Luteibacter rhizovicinus* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 2025-2032, 2013.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245-R249, 1998.

HAQ, I. et al. Evaluation of bioremediation potentiality of ligninolytic *Serratia liquefaciens* for detoxification of pulp and paper mill effluent. **Journal of hazardous materials**, v. 305, p. 190-199, 2016.

HARRIS, J. A. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 801-808, 2003.

HILDEBRAND, F. et al. LotuS: an efficient and user-friendly OTU processing pipeline. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 1, 2014.

HUSAIN, Q. β Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41-62, 2010.

HUSON, D. H. et al. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome research**, v. 17, n. 3, p. 377-386, 2007.

JACOBI, A.; ROSSMANN, R.; BÖCK, A. The hyp operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. **Archives of microbiology**, v. 158, n. 6, p. 444-451, 1992.

JOHANSEN, J. E. et al. *Luteibacter rhizovicinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. 6, p. 2285-2291, 2005.

JOSHI, N. A.; FASS J. N. **Sickle**: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files. V. 1.33 [Software]. 2011. Disponível em: <<https://github.com/najoshi/sickle>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

JUERS, D. H.; MATTHEWS, B. W.; HUBER, R. E. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. **Protein Science**, v. 21, n. 12, p. 1792-1807, 2012.

KÄMPFER, P. The family Streptomycetaceae, part I: taxonomy. In: **The prokaryotes**. Springer New York, 2006. p. 538-604.

KAY, I. R.; HERRON, G. A. Evaluation of existing and new insecticides including spirotetramat and pyridalyl to control *Frankliniella occidentalis* (Pergande)(Thysanoptera: Thripidae) on peppers in Queensland. **Australian Journal of Entomology**, v. 49, n. 2, p. 175-181, 2010.

KWON, S. et al. *Arenimonas donghaensis* gen. nov., sp. nov., isolated from seashore sand. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 5, p. 954-958, 2007.

KOCHARIN, K. et al. Engineering of acetyl-CoA metabolism for the improved production of polyhydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012.

KOSTKA, J. E. et al. Genome sequences for six *Rhodanobacter* strains, isolated from soils and the terrestrial subsurface, with variable denitrification capabilities. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4461-4462, 2012.

KUŽNER, J. et al. Confirmation of the efficacy of a novel fipronil spot-on for the treatment and control of fleas, ticks and chewing lice on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 245-251, 2013.

LADOUKAKIS, E.; KOLISIS, F. N.; CHATZIIOANNOU, A. A. Integrative workflows for metagenomic analysis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 2, 2014.

LANGILLE, M. G. I. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814-821, 2013.

LANGILLE, M. **microbiome_help/biom_to_stamp.py**. [Software]. 2015. Disponível em: <https://github.com/mlangill/microbiome_helper/blob/master/biom_to_stamp.py>. Acesso em: 22 ago. 2016.

LEVENFORS, J. J. et al. Broad-spectrum antifungal metabolites produced by the soil bacterium *Serratia plymuthica* A 153. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 677-685, 2004.

LI, Z. et al. 2-Phenyl-5, 6-dihydro-2H-thieno [3, 2-c] pyrazol-3-ol derivatives as new inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 13, n. 15, p. 2591-2594, 2003.

LOPEZ-ANTIA, A. et al. Assessing the Risk of Fipronil-Treated Seed Ingestion and Associated Adverse Effects in the Red-Legged Partridge. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 22, p. 13649-13657, 2015.

EUZÉBY, J. P.; PARTE, A. C. **LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature**, 2015. [Enciclopédia *online*]. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em: 10 set. 2016.

MAGURRAN, A. E. **Measuring biological diversity**. John Wiley & Sons, 2004.

MANDAL, K. et al. Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 93, p. 87-92, 2013.

MANDAL, K. et al. Bioremediation of fipronil by a *Bacillus firmus* isolate from soil. **Chemosphere**, v. 101, p. 55-60, 2014.

MANOHARAN, L. et al. Captured metagenomics: large-scale targeting of genes based on ‘sequence capture’ reveals functional diversity in soils. **DNA Research**, p. dsv026, 2015.

MARKOWITZ, V. M. et al. IMG/M 4 version of the integrated metagenome comparative analysis system. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D568-D573, 2014.

MASUTTI, C. S. M.; MERMUT, A. R. Degradation of fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco, Brazil. **Journal of environmental science and health part B**, v. 42, n. 1, p. 33-43, 2007.

MCDONALD, D. et al. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. **GigaScience**, v. 1, n. 1, p. 1, 2012a.

MCDONALD, D. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME journal**, v. 6, n. 3, p. 610-618, 2012b.

MELO, A. S. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade. **Biota Neotropical**, v. 8, n. 3, p. 21-27, 2008.

MENDES, Lucas W. et al. Soil-borne microbiome: linking diversity to function. **Microbial ecology**, v. 70, n. 1, p. 255-265, 2015.

MERKOWSKY, K. et al. Fipronil induces lung inflammation *in vivo* and cell death *in vitro*. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2016.

MERRIMAN, B. et al. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. **Electrophoresis**, v. 33, n. 23, p. 3397-3417, 2012.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1, 2008.

MIDDELBOS, I. S. et al. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9768, 2010.

MORALES-RODRIGUEZ, A.; WANNER, K. W. Efficacy of thiamethoxam and fipronil, applied alone and in combination, to control *Limoniuss californicus* and *Hypnoidus bicolor* (Coleoptera: Elateridae). **Pest management science**, v. 71, n. 4, p. 584-591, 2015.

NAM, Y.; LEE, S.; LIM, S. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. **International journal of food microbiology**, v. 155, n. 1, p. 36-42, 2012.

NARAHASHI, T. et al. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. **Human & experimental toxicology**, v. 26, n. 4, p. 361-366, 2007.

NARAHASHI, T. et al. Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 97, n. 2, p. 149-152, 2010.

NAYFACH, S. et al. An integrated metagenomics pipeline for strain profiling reveals novel patterns of transmission and global biogeography of bacteria". **bioRxiv**, 2016.

NIEPCERON, M. et al. GammaProteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils. **Environmental pollution**, v. 180, p. 199-205, 2013.

NOGUEIRA, I. de S. et al. Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. **Hoehnea**, v. 35, n. 2, p. 219-233, 2008.

PALLMANN, P. et al. Assessing group differences in biodiversity by simultaneously testing a user-defined selection of diversity indices. **Molecular ecology resources**, v. 12, n. 6, p. 1068-1078, 2012.

PARKS, D. H. et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014.

PETROSINO, J. F. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

PISA, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68-102, 2015.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Molecular biology and evolution**, v. 26, n. 7, p. 1641-1650, 2009.

PRULLAGE, J. B. et al. Efficacy of a novel topical combination of fipronil,(S)-methoprene, eprinomectin and praziquantel against induced infections of *Ancylostoma* spp. nematodes of cats. **Veterinary parasitology**, v. 202, n. 1, p. 30-33, 2014.

PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of microbiological methods**, v. 107, p. 30-37, 2014.

QU, H. et al. Environmental behavior of the chiral insecticide fipronil: Enantioselective toxicity, distribution and transformation in aquatic ecosystem. **Water Research**, 2016.

QUINCE, C. et al. Removing noise from pyrosequenced amplicons. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

RATRA, G. S.; CASIDA, J. E. GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. **Toxicology letters**, v. 122, n. 3, p. 215-222, 2001.

ROESCH, L. F. W. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME journal**, v. 1, n. 4, p. 283-290, 2007.

REHBEIN, S. et al. Efficacy against nematode and cestode infections and safety of a novel topical fipronil,(S)-methoprene, eprinomectin and praziquantel combination product in domestic cats under field conditions in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 1, p. 10-17, 2014.

REICHENBACH, H. The genus *Lysobacter*. In: *The Prokaryotes*. Springer New York, 2006. p. 939-957.

SADDLER, G. S.; BRADBURY, J. F. Xanthomonadales ord. nov. In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Springer US, 2005. p. 63-122.

SAEED, A.; LARIK, F. A.; CHANNAR, P. A. Recent synthetic approaches to fipronil, a super-effective and safe pesticide. In: **Research on Chemical Intermediates**. Springer Holanda, 2016. p. 1-9.

SCHLEIFER, K. Phylum XIII. Firmicutes. In: VOS, P. et al. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. Springer Science & Business Media, 2009. p. 19.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 955-962, 2007.

SCHMITT, S.; HENTSCHEL, U.; TAYLOR, M. W. Deep sequencing reveals diversity and community structure of complex microbiota in five Mediterranean sponges. **Hydrobiologia**, v. 687, n. 1, p. 341-351, 2012.

SCHOCH, C. L. et al. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. **Database**, v. 2014, p. bau061, 2014.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, p. 379-423.

SHARMA, S.; VAKHLU, J. Metagenomics as advanced screening methods for novel microbial metabolite. **Microbial Biotechnology Progress and Trends**, p. 43-62, 2014.

SILVA, C. M. M. S.; ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. ed. **Microbiologia Ambiental: manual de laboratório**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, p. 98, 2000.

SILVA, M. H.; KOSHLUKOVA, S. Comparative Toxicity of Endosulfan and Fipronil Insecticides: Utilizing *In Vivo* and *In Vitro* Data. **Journal of Medical Toxicology and Clinical Forensic Medicine**, 2015.

SILVA, R. de O. et al. Degradation and sorption of fipronil and atrazine in Latossols with organic residues from sugarcane crop. **Ciência Rural**, v. 46, n. 7, p. 1172-1177, 2016.

SIMON-DELISO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5-34, 2015.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, v. 163, p. 688-688, 1949.

SOMLEVA, M. N.; PEOPLES, O. P.; SNELL, K. D. PHA bioplastics, biochemicals, and energy from crops. **Plant biotechnology journal**, v. 11, n. 2, p. 233-252, 2013.

SOUZA, T. F. de. Efeitos das doses subletais de fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais. 2009. 38 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 2009.

SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D. L. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome—from an agriculture perspective. **Frontiers in plant science**, v. 6, 2015.

SUENAGA, H. Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 1, p. 13-22, 2012.

TALFOURNIER, F.; STINES-CHAUMEIL, C.; BRANLANT, G. Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis* substrate specificity and coenzyme A binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 25, p. 21971-21981, 2011.

TAVARES, M. A. **Mecanismos de toxicidade dos metabólitos do fipronil, dessulfenil e sulfona, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato**. 2015. 65f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. 2015.

THAKUR, D. et al. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 17, n. 4, p. 242-249, 2007.

TINGLE, C. C. D. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. In: WARE, G.W. (ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer Nova York, 2003. p. 1-66.

TORSVIK, V.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, n. 3-4, p. 170-178, 1996.

TREANGEN, T. J. et al. MetAMOS: a modular and open source metagenomic assembly and analysis pipeline. **Genome biology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

UFARTÉ, L. et al. Metagenomics for the discovery of pollutant degrading enzymes. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1845-1854, 2015.

ULLOA-CHACÓN, P.; JARAMILLO, G. I. Effects of boric acid, fipronil, hydramethylnon, and diflubenzuron baits on colonies of ghost ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of economic entomology**, v. 96, n. 3, p. 856-862, 2003.

UNIYAL, S. et al. Degradation of fipronil by *Stenotrophomonas acidaminiphila* isolated from rhizospheric soil of *Zea mays*. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016a.

UNIYAL, S. et al. Isolation and Characterization of Fipronil Degrading *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter oleivorans* from Rhizospheric Zone of *Zea mays*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, p. 1-6, 2016b.

VAN DEN HEUVEL, R. N. et al. Denitrification at pH 4 by a soil-derived *Rhodanobacter*-dominated community. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 12, p. 3264-3271, 2010.

VIDAU, C. et al. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 6, p. 935-943, 2011.

VIGNAIS, P. M.; BILLOUD, B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. **Chemical reviews**, v. 107, n. 10, p. 4206-4272, 2007.

XIE, Y. et al. Bioactive natural products from *Lysobacter*. **Natural product reports**, v. 29, n. 11, p. 1277-1287, 2012.

WAGG, C. et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5266-5270, 2014.

WANG, Q. et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WHITELEY, A. S. et al. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. **Journal of microbiological methods**, v. 91, n. 1, p. 80-88, 2012.

WILLIAMS, S. T.; FLOWERS, T. H. The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomycetes. **Microbios**, v. 20, n. 80, p. 99-106, 1977.

WOOLEY, J. C.; GODZIK, Adam; FRIEDBERG, Iddo. A primer on metagenomics. **PLoS Comput Biol**, v. 6, n. 2, p. e1000667, 2010.

WU, H. et al. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 115, p. 9-14, 2014.

WU, J. et al. Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. **Science of The Total Environment**, v. 518, p. 139-147, 2015.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 1, 2016.

YING, G.; KOOKANA, R. Laboratory and field studies on the degradation of fipronil in a soil. **Soil Research**, v. 40, n. 7, p. 1095-1102, 2002.

ZAHEER, A. et al. Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. **Research in microbiology**, v. 167, n. 6, p. 510-520, 2016.

ZALUSKI, R. et al. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 5, p. 1062-1069, 2015.

ZHAO, X. et al. Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 914-924, 2003.

ZHANG, J. et al. Response of bacteria and fungi in soil microcosm under the presence of pesticide endosulfan. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 4, p. 1-9, 2015.

ANEXO A – Análise química do solo coletado

Análise Química	Valores
P (mg/dm ³)	3,46
Ca (cmol _c /dm ³)	4,04
Mg (cmol _c /dm ³)	1,93
K (cmol _c /dm ³)	0,27
Al (cmol _c /dm ³)	0,00
H+Al (cmol _c /dm ³)	2,30
pH CaCl ₂	6,19
pH H ₂ O	6,74
pH SMP	6,83
T (cmol _c /dm ³)	8,52
SB (cmol _c /dm ³)	6,23
V%	73,06

Fonte: Laboratório da FCA