METAGENÔMICA APLICADA À BIOTECNOLOGIA

METAGENOMICS APPLIED TO BIOTECHNOLOGY

Karla Cristina Stropa Goulart[(11)]

Wellington Pine Omori[(2)]

Jackson Antônio Marcondes de Souza[(3)]

Resumo

O solo é um dos mais complexos e desafiantes ambientes para os microbiologistas, contendo a maior diversidade microbiana do planeta. A biodiversidade existente no solo é considerada como um potencial científico a ser explorado, contudo, o isolamento microbiológico tradicional limita a obtenção de grande parte da microbiota presente. A metagenoma possibilita o acesso à comunidade microbiana total, inclusive permite identificar micro-organismos incultiváveis em laboratório. A exploração da microbiota do solo desvenda características taxonômicas do ambiente, fator crucial à preservação da diversidade. A metagenoma possibilita não apenas a identificação dos micro-organismos como também desvendar o enorme *pool* de genes desconhecidos que codificam novas enzimas e proteínas. Atualmente, a busca mundial por novos biocatalisadores envolvendo a pesquisa com etanol de segunda geração, é apontada como principal responsável pela utilização de ferramentas moleculares. A proposta de muitos pesquisadores e cientistas corrobora com a utilização de métodos invasivos à microbiota do solo, já que o mesmo é indiscutível em termos de biodiversidade, acoplada certamente à catalisadores biológicos com possível aplicação biotecnológica. Desvendar o ambiente do solo é possibilitar avanços científicos fundamentais para o crescimento econômico mundial.

Palavras-chave: Biodiversidade, *16S rDNA*, *18S rDNA*, Solo.

Abstract

Soil contains the higher microbial diversity in Earth and also constitutes one of complex and challenging environment for microbiologists. There is unlimited scientific potential to be explored on soil studies but the isolation of microbiote by traditional microbiological techniques is limited by disposable knowledge on cultivation conditions. Metagenomics possibilities the access to total microbial communities present in virtual any ecosystem and

[1] Doutoranda em Microbiologia Agropecuária. FCAV-Unesp. karla@posgrad.fcav.unesp.br
[2] Mestrando em Microbiologia Agropecuária. FCAV-Unesp. wpomori@hotmail.com
[3] Professor Assistente Doutor no departamento de biologia. FCAV-Unesp. jackson@fcav.unesp.br

the identification of uncultivable microorganisms. In turn, the exploration of soil microbiome reveals taxonomic characteristics that are crucial for diversity preservation. Metagenomics also collaborates to prospection of a huge pool of unknown genes which codifies important proteins and enzymes with biotechnological potential. Currently, the global search for new biocatalysts includes research based on second generation ethanol and configures the major source for application of molecular tools. Many scientists and researchers corroborates the utilization of invasive methods to access soil microbiome once it is unquestionable its richness in biodiversity and biocatalysts concerning biotechnological application. Disclosure soil environment conditions is bring forth fundamental scientific advances for increase global economics.

Keywords: *Biodiversity, 16S rDNA, 18S rDNA, Soil.*

1 Introdução

Análises metagenômicas de amostras ambientais têm sido propostas por ser a mais acurada técnica para descrição de comunidades microbianas presentes em um habitat (von MERING, C. P. *et al*., 2007). O solo representa a maior fonte de diversidade microbiana em todo o planeta, sendo essa biodiversidade oculta e representativa de um grande recurso inexplorado na obtenção de produtos naturais com potencial para aplicação na agricultura e outras áreas que envolvem a biotecnologia (SLEATOR *et al*., 2008).

A metagenoma elucida genomas de micro-organismos incultiváveis com o objetivo de melhorar a compreensão a cerca da ecologia microbiana global e direcionar as pesquisas visando o aumento na descoberta de novas enzimas e biomoléculas (SCHMEISSER *et al*., 2007). A diversidade microbiana em ambientes como o solo, sedimentos ou água têm sido acessada pela análise de genes considerados "relógios moleculares", como os *RNAs* ribossômicos *16S rRNA*, *18S rRNA* e os espaçadores transcritos internos (*ITS*), devido a esses apresentarem regiões conservadas que podem ser utilizadas na comparação e classificação taxonômica dos micro-organismos. Desde a clonagem e sequenciamento, o processo é relativamente rápido e considerado uma poderosa ferramenta para entendimento da dinâmica e diversidade das comunidades microbianas dos mais diversificados ambientes (PETROSINO *et al*., 2009). A tecnologia metagenômica vinculada aos genes constitutivos alcança uma nova dimensão na caracterização da complexidade que se forma a partir da interação (ou sinergismo) existente entre as diferentes comunidades microbianas, o que desperta cada vez

mais o interesse dos cientistas quanto à caracterização e interpretação das ações desempenhadas pelos micro-organismos nos mais variados ambientes, como o solo.

A identificação microbiológica do solo permite realizar pesquisas que acarretam em avanços consideráveis, como a busca por enzimas envolvidas no processo de obtenção de biocombustíveis, por exemplo. Enzimas disponíveis no ambiente de solo desempenham função bioquímica em todos os processos de decomposição da matéria orgânica no sistema (SINSABAUGH *et al*., 1991). Dentro das aplicações que envolvem o interesse biotecnológico, a melhor compreensão da atividade destas enzimas no ecossistema abre uma oportunidade única de acesso aos recursos enzimáticos derivados dos mais variados micro-organismos existentes no solo e que podem ser relevantes para as mais variadas aplicações (HANDELSMAN *et al*., 1998).

O acesso às sequencias metagenômicas das comunidades microbianas presentes no solo, permite a identificação e exploração de novos biocatalisadores com importância biotecnológica. Com este intuito, a presente revisão foca a metodologia atualmente aplicada na descrição ambiental dos micro-organismos, e agrega questões onde a aplicação e exploração de biomoléculas se torna possível devido à utilização de ferramentas moleculares.

2 Revisão de literatura

Micro-organismos têm sido integrados na história e função de vida na Terra, executando um papel central no clima, geologia, geoquímica e evolução biológica (XU, 2006). O universo microbiano vem sendo explorado há tempos pela humanidade. Há indícios históricos de que babilônios e sumérios no ano 6 mil a.C. utilizavam cereais para produzir bebidas alcoólicas por meio de processos fermentativos. Egípcios utilizaram fermento em meados do ano 2 mil a.C., para a fabricação de cerveja e pão (BUD, 1993). A invenção do microscópio por Anton van Leeuwenhock abriu caminhos para o que ainda estava encoberto, como a descrição da existência de seres microscópicos no século 17. Os micro-organismos envolvidos na fermentação foram elucidados como responsáveis pelo processo em 1876 por Louis Pasteur. Conseguinte a este, Robert Koch descreveu meios de cultivo com ágar para isolamento de micro-organismos - base fundamental para a microbiologia clássica bacteriana (KELLER e ZENGLER, 2004).

Houve indícios da existência de enzimas em 1897 por Eduard Buchner pontuando que a conversão de açúcar em álcool ocorrera na ausência de células vivas. Um advento importante na história microbiológica ocorreu no período de crise mundial, em 1929, quando Alexander Fleming trabalhando com *Staphylococcus aureus* observou que seu desenvolvimento em placas de cultivo, era inibido na presença de certo contaminante, o fungo *Penicillium notatum* (DEMAIN, 2006).

Na década de 50 houve um marco na história científica com a descoberta da molécula de DNA por James Watson e Francis Crick, que revolucionou conceitos e teorias descritas proporcionando caminhos importantes nas pesquisas. Após desvendarem a molécula da vida com o artigo intitulado "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid", a manipulação molecular avançou consideravelmente. Técnicas de manipulação gênica progrediram na década de 70, período em que a biotecnologia passou a existir de fato. A microbiologia clássica em harmonia com a biologia molecular possibilitou o surgimento de novas ferramentas moleculares como a metagenoma.

3 Riqueza da comunidade microbiana ambiental

As comunidades microbianas contem uma complexidade incomparável, o que as torna recalcitrante para descrever e comparar. A caracterização desta complexidade contribuirá para o entendimento de processos ecológicos que direcionam interações micro-organismo-hospedeiro, biorremediação e biogeoquímica. Além disso, uma estimativa da riqueza de espécies de um ambiente é um indicativo da plenitude do perfil de uma comunidade. Há dificuldade em estimar a diversidade de uma comunidade microbiana, devido à estrutura desta que raramente se encaixa a uma distribuição bem definida (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2007).

Métodos de análise molecular da comunidade microbiana têm revolucionado nosso entendimento de diversidade e distribuição de bactérias, arqueias e micro-organismos eucariotos. As informações obtidas têm adequadamente demonstrado que a análise de sistemas modelo microbianos podem prover importantes percepções dentro da funcionalidade e estabilidade de um ecossistema (BENT e FORNEY, 2008). O acesso acurado da composição destas comunidades microbianas nos permite caracterizar padrões espaciais e temporais de diversidade, bem como respostas a mudanças nas condições ambientais,

perturbações e tratamentos. O primeiro passo é alcançar um consenso em relação a que inferência pode ou não pode ser feita no que se refere à estrutura da comunidade microbiana dada à inerente limitação imposta por métodos utilizados em estudos sobre a ecologia microbiana e pela diversidade extraordinária encontrada na maioria dos habitats (DAHLLOF, 2002; WARD, 2002).

O número total de células microbianas na Terra está estimado em 10^{30} (TURNBAUGH e GORDON, 2008). Os genomas destas espécies, principalmente as incultiváveis, codificam um reservatório inexplorado de novas enzimas e importantes metabólitos.

O solo é um dos mais complexos e desafiantes ambientes para os microbiologistas, contendo a maior diversidade microbiana do planeta. A maioria destes micro-organismos ainda não estão caracterizados e representam um reservatório enorme de diversidade genética e metabólica ainda não muito explorado (MOCALLI e BENEDETTI, 2010). Devido à imensa heterogeneidade física, química e biológica, o solo é considerado o ambiente microbiano mais diverso no mundo (DANIEL, 2005). Há estimativa de que 1 grama de solo pode conter até 10^9 células microbianas, representando mais de 10.000 genomas (TORSVIK e OVREAS, 2002). O número total de células procarióticas presentes no solo, por exemplo, está estimado em 4-6 x 10^{30} incluindo 10^6 – 10^8 genomas individuais pertencentes a diferentes espécies (SLEATOR *et al*., 2008). Métodos de quantificação celular em áreas de interesse agronômico têm papel fundamental na economia brasileira (STROPA, 2009). Por esta razão, é crucial o acesso e preservação da diversidade dos micro-organismos do solo, por conterem um grande conjunto de genes desconhecidos que codificam novas enzimas e proteínas (MOCALLI e BENEDETTI, 2010).

4 Estratégia para acessar a diversidade de micro-organismos do solo

O termo diversidade é um conceito geral ecológico que tem vários significados e medidas, os quais são freqüentemente utilizados. O cálculo de um indicativo de diversidade envolve uma informação refinada contida em dados de análise de comunidade dentro de um simples valor numérico que reflete o número e abundância relativa de filotipos em uma única comunidade microbiana. A utilização de medidas de diversidade, de fato é a captura de informações a respeito da biodiversidade resumindo riqueza e regularidade dentro de um número real (BENT e FORNEY, 2008).

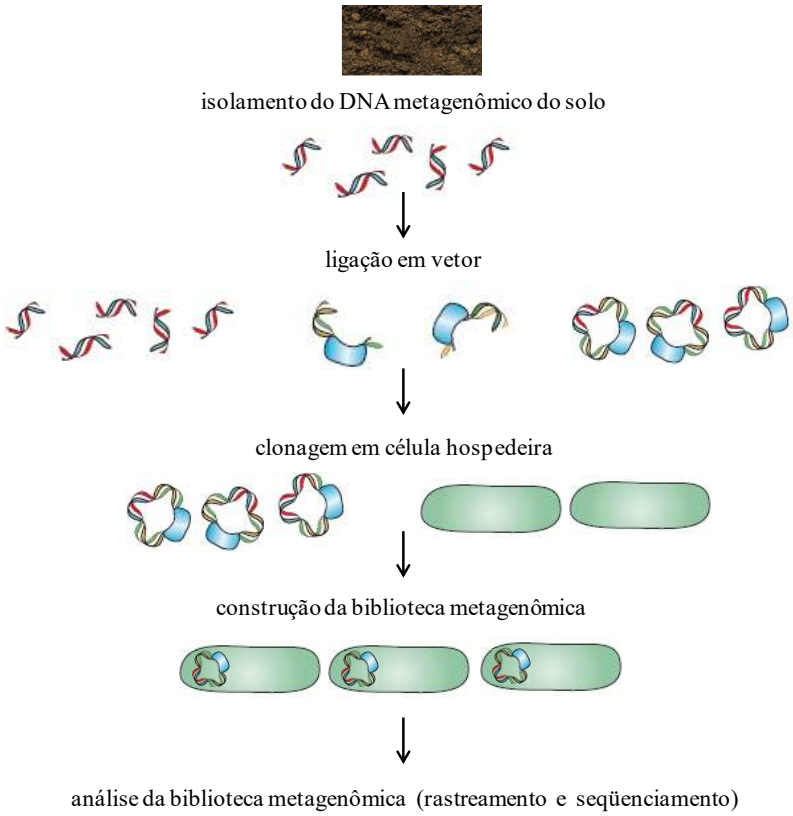
A microbiologia tem passado por uma transformação durante os últimos 25 anos, que tem alterado a visão dos microbiologistas de como estudar certas peculiaridades dos micro-organismos. A percepção de que muitos dos micro-organismos não podiam ser cultivados em laboratório, fomentou uma revolução na microbiologia. O estudo de micro-organismos não cultiváveis tem expandido do "Quem está lá?" para "O que eles estão fazendo lá?". A mudança desencadeou várias técnicas, incluindo a análise genética de um conjunto de micro-organismos (HANDELSMAN, 2004).

O acesso às informações de diversidade do solo é possível por meio do isolamento do DNA total de uma amostra ambiental. O cultivo e isolamento de micro-organismos é um método tradicional de microbiologia, porém, somente 0,1 a 1,0% da microbiota do solo são cultiváveis por meio de métodos padrões (TORSVIK *et al*., 1990; AMANN *et al*., 1995; TORSVIK *et al*., 2002). O DNA coletivo da biota do solo é acessado utilizando-se da metagenoma (HANDELSMAN *et al*., 2008). O conceito de metagenoma é o acesso ao DNA microbiano total extraído de uma amostra ambiental independente de cultivo, incluindo clonagem e análise da amostra. A metagenoma é uma poderosa ferramenta para explorar a ecologia e perfil metabólico do complexo ambiente das comunidades microbianas, bem como identificar novas biomoléculas pelo uso de bibliotecas construídas oriundas de ácidos nucléicos isolados (DANIEL, 2005; FERRER *et al*., 2009; HANDELSMAN, 2004; SIMON e DANIEL, 2010; STEELE *et al*., 2009). Muitos trabalhos de diversidade da microbiota do solo por meio da metagenoma vêm sendo estudado (SILVEIRA *et al*., 2006; VAL-MORAES *et al*., 2009; PEREIRA *et al*., 2006). Alguns protocolos para isolamento de DNA microbiano oriundo do solo foram publicados (OGRAM *et al*., 1987; LLOYD e HUNTER, 2001).

A construção de bibliotecas metagenômicas inicia-se pelo isolamento de DNA de alta qualidade que seja adequado para clonagem e represente a diversidade microbiana presente na amostra original.

As etapas para a construção de bibliotecas metagenômicas incluem: *(i)* isolamento de DNA do solo; *(ii)* ligação do DNA em vetor específico; *(iii)* clonagem do DNA e inserção do vetor em célula hospedeira; *(iv)* construção da biblioteca metagenômica; e *(v)* rastreamento dos clones da biblioteca (Figura 01).

FIGURA 1 - Esquema geral das etapas que envolvem a construção de bibliotecas metagenômicas (Fonte: adaptado de Daniel, R. 2005, p. 2).



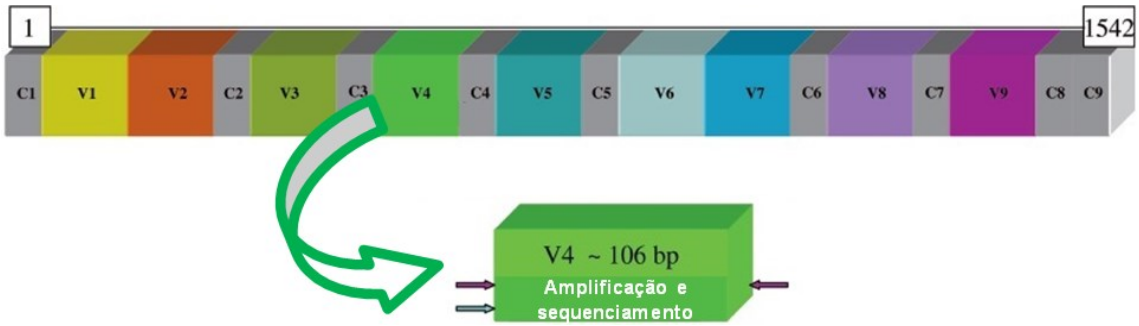
5 Marcadores moleculares utilizados na identificação de micro-organismos

Em 1987 Woese discorreu sobre a classificação filogenética com base em detalhes morfológicos para plantas e animais ser relativamente mais fácil visto a riqueza em detalhes morfológicos complexos que esses organismos apresentam em relação às bactérias, que possuem características mais simples. A classificação de organismos com base na fisiologia se torna complexa tendo em vista as "armadilhas" que a técnica pode resultar, fazendo com que ocorram erros classificatórios. Como alternativa a essas "armadilhas" o uso de genes do *RNA* ribossômico (*rRNA*) como marcadores moleculares foi considerado mais vantajoso visto a sua elevada regularidade funcional entre micro-organismos, permitindo que durante a classificação filogenética ocorra a identificação do táxon mais elevado.

O gene *16S rRNA* (ou *16S rDNA*) presente em procariotos, pode ser utilizado na identificação de bactérias em análises utilizando sequênciamento de DNA, seja ele proveniente de isolados ou metagenoma (HANDELSMAN *et al*., 1998; KAKIRDE *et al*.,

2010). Este gene possui aproximadamente 1.500 pares de bases (pb) e apresenta 9 regiões conservadas intercaladas com 9 regiões variáveis, onde o comprimento de cada região varia de organismo para organismo. Essa estrutura pode ser sequenciada utilizando métodos de Sanger ou Pirosequenciamento (Figura 2).

FIGURA 2 - Especificação das regiões conservadas e variáveis presentes no gene *16S rRNA*. As regiões identificadas como C1-9 são referentes às regiões conservadas e as identificadas como V1-9, representam as regiões variáveis. As setas no detalhe representam possíveis regiões de pareamento de oligoiniciadores (primes) para a amplificação ou sequenciamento (Adaptado de PETROSINO *et al*., 2009).

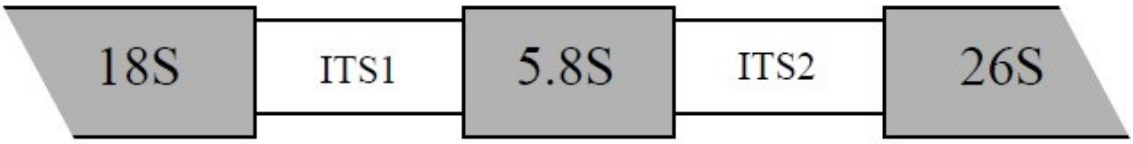


Na área clínica, a identificação do agente patogênico é de extrema importância, visto os danos ocasionados pelo mesmo ao hospedeiro e por essa razão a sua classificação permite atribuir inferências quanto a associação patológica e terapia antimicrobiana mais eficaz (CLARRIDGE, 2004; JANDA *et al*., 2007). Na área de biorremediação pode ser realizado um estudo da comunidade microbiana associada à degradação de agentes contaminantes, como o óleo diesel. O Brasil é um dos maiores produtores de óleo de petróleo no mundo e preocupações quanto ao risco de acidentes ambientais é uma constante. Os compostos de petróleo possuem em sua composição, diferentes componentes como alcenos e uma infinidade de compostos aromáticos que podem ser degradados pelos micro-organismos endógenos isolados de áreas contaminadas. Esses micro-organismos podem ser utilizados em lugares impactados para a recuperação natural do ambiente através da conversão das moléculas complexas em substâncias inertes. Estudos visando desvendar a identificação de isolados ou das comunidades procarióticas que atuam na degradação de óleo diesel são desenvolvidos em todo o mundo, proporcionando uma melhor compreensão da ação microbiana sobre moléculas derivadas de misturas ou queima de hidrocarbonetos (OLIVEIRA *et al*., 2008; PAIXÃO *et al*., 2010; KHANNA *et al*., 2012).

Outro marcador frequentemente utilizado na identificação e classificação filogenética de micro-organismos é a região dos espaçadores transcritos internos (ITS, do inglês "Internal Transcribed Spacer") que é comum aos procariotos e eucariotos. Nos procariotos a região ITS está localizada entre uma região operon que contém genes codificantes para três RNA's (16S, 23S e 5S) que estão presente em múltiplas cópias no genoma bacteriano. Boyer e colaboradores (2001) avaliaram a variação dos operons de cinco espécies de cianobactérias: *Scytonema hyalinum*, *Tolypothrix distorta*, *Calothrix parietina*, *Coelodesmium wrangelii* e dois isolados que pertenciam a um novo gênero putativo (identificados como SRS6 e SRS70). As análises comparativas mostraram diferenças nos tamanhos das regiões ITS em pares de base dos isolados pertencentes ao novo gênero em relação a *C. parietina* (347 pb) e *S. hyalinum* (648 pb), além de apresentar presença e ausência de certos RNA's transcritos.

Em eucariotos, a região ITS 1 e ITS 2 está localizada entre os genes *18S-26S* do *rRNA* (Figura 3) que também podem ser amplificadas com o auxílio de primers específicos.

FIGURA 3 - As regiões ITS 1 e ITS 2 presente em eucariotos são flanqueadas pelos genes *18S-26 rRNA*. Em procariotos a região ITS é flanqueada pelos genes *16S-23S rRNA* (BOYER *et al*., 2001; MIRANDA *et al*., 2010).



Miranda e colaboradores (2010) realizaram extração de DNA de tecidos de plantas carnívoras da espécie *Drosera* (pertencente à família Droseraceae) e realizaram a amplificação das regiões ITS 1 e ITS 2 utilizando primers "universais". Após o sequenciamento o resultado verificado pelo programa BLASTN, disponível no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI, disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome>), foi relacionado a fungos basidiomicetos e não a espécies de *Drosera*, resultado que não era esperado. Em outras análises os autores conseguiram classificar filogeneticamente as sequências obtidas com o grupo dos fungos basiomicetos, conforme atestado pelo BLASTN, ao utilizar outras ferramentas (softwares) apropriadas para este objetivo. Esta amplificação inesperada foi atribuída a provável mistura de DNA's no processo de extração do DNA do

tecido de *Drosera*, podendo significar que o protocolo utilizado na extração ainda precisa ser melhorado para a obtenção de melhores resultados.

A agricultura da soja (*Glycine max* [L.] Merrill) ocupa posição de destaque na economia brasileira apresentando 49% da área plantada em grãos no país onde a indústria transforma cerca de 30.7 milhões de toneladas de soja por ano, que podem ser convertidas em óleo comestível e farelo proteico (MAPA, 2012). Em 2001 foi constatada na cidade de Londrina-PR a presença da ferrugem asiática da soja que é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e, posteriormente, foi verificada a dispersão deste agente fitopatológico por todo o Brasil (AZEVEDO *et al*., 2007; AGUIAR JR *et al*., 2011). Análises das duas regiões ITS de isolados brasileiros de *P. pachyrhizi* apontam pouca variação de nucleotídeos nessas regiões quando comparado com outras sequências depositadas no GenBank (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), presente no NCBI, o que não está de acordo com outros estudos. Isso mostra que outras análises precisam ser realizadas para o melhor entendimento desta variação de dados. O padrão identificado quanto ao estudo filogeográfico evidenciou que alguns micro-organismos isolados no Brasil possuíam características de partilhar um mesmo ancestral com ribotipos Africanos do que com Asiáticos. Isso suporta a teoria de que a dispersão deste agente fitopatogênico em forma de esporos se deu por corrente de ar transatlântica a partir da África (FREIRE *et al*., 2008).

Esses estudos comprovam a premissa de que genes constitutivos podem ser utilizados como método de identificação de sequencias, mesmo que derivados de amostras metagenômicas, permitindo explorar e inferir a diversidade da microbiota de ambientes sob condições diversificadas e avaliar a relevância que esta diversidade ocasiona ao ambiente estudado.

6 Considerações finais

Os micro-organismos são os maiores responsáveis por atividades metabólicas e fluxo de energia em ambientes como o solo, sendo este considerado um reservatório de diversidade genética e funcional. A riqueza da diversidade microbiana e atividades metabólicas são acessadas por meio da metagenoma com avanços consideráveis particularmente no estudo de bioenergia. O universo microbiano no solo é uma fonte de pesquisa que fomenta explorações tanto de interesse econômico quanto ecológico. A perspectiva da pesquisa nesta área certamente possibilitará o conhecimento e possível aplicação biotecnológica congruente.

7 Referências

AGUIAR JR, H. O. *et al*. Adjuvantes e assistência de ar em pulverizador de barras sobre a deposição da calda e controle de *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & Sydow). **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p.103-109, 2011.

AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n, 1, p. 143-169, 1995.

AZEVEDO, L. A. S.; JULIATTI, F. C.; BARRETO, M. Resitência de genótipos de soja à *Phakopsora pachyrhizi*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p.252-257, 2007.

BENT, S. J.; FORNEY, L. J. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. **International Society for Microbial Ecology**, v. 2, p. 689-695, 2008.

BOYER, S. L.; FLECHTNER, V. R.; JOHANSEN, J. R. Is the 16S-23S rRNA Internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 6, p.1057-1069, 2001.

BUD, R. **The use of life:** a history of Biotechnology**.** Cambridge University Press, 1993, 264p.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p.840-862, 2004.

DAHLLOF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 213-217, 2002.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p.470-478, 2005.

DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p.486–495, 2006.

FERRER, M. A., BELOQUI, A., TIMMIS, K. N., GOLYSHIN, P. N. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n.1-2, p. 109-123, 2009.

FREIRE, M. C. M.; OLIVEIRA, L. O.; ALMEIDA, A. M. R.; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M. A.; LIEBENBERG; M. M.; MIENIE, C. M. S. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p.920-931, 2008.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RODON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular Biological Access to the Chemistry of Unknown Soil Microbes: a New Frontier for Natural Products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p.245-249, 1998.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p.2761-2764, 2007.

KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p.1911-1923, 2010.

KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews**, v. 2, n. 2, p. 141-150, 2004.

KHANNA, P.; GOYAL, D.; KHANNA, S. Characterization of pyrene utilizing Bacillus spp. from crude oil contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p.606-617, 2012.

LLOYD-JONES, G. & HUNTER, D. W. F. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, n. 15, p. 2053-2059, 2001.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Soja.** 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>. Acesso em: 14 nov. 2012.

MIRANDA, V. F. O.; MARTINS, V. G.; FURLAN, A.; BACCI JR., M. Planto r fungal sequence? An alternative optimized PCR protocol to avoid ITS (nrDNA) misamplification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p.141-152, 2010.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497-505, 2010.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 7, n. 2-3, p. 57–66, 1987.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; SIMIONI, K. C. M.; SANTOS NETO, E. V. Bacterial diversity characterization in petroleum samples from Brazilian reservoirs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p.445-452, 2008.

PAIXÃO, D. A. A.; DIMITROV, M. R.; PEREIRA, R. M.; ACCORSINI, F. R.; VIDOTTI, M. B.; LEMOS, E. G. M. Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p.773-781, 2010.

PEREIRA, R. M; SILVEIRA, E. L; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Molecular

characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 439-447, 2006.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. The Last Word: Books as a Statistical Metaphor for Microbial Communities. **Annual Review Microbiology**, v. 61, p. 23-34, 2007.

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.

SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.

SIMON, C.; DANIEL, R. Construction of small-insert and large-insert metagenomic libraries. **Methods in Molecular Biology**, v. 668, p. 39-50, 2010.

SINSABAUGH, R. L.; ANTIBUS, R. K.; LINKINS, A. E. An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. **Agriculture, Ecosystems Environment**, v. 34, n. 1-4, p. 43-54, 1991.

SLEATOR, R. D. C., SHORTALL, C., HILL, C. Metagenomics. **Letters Applied Microbiology**, v. 47, p. 361-366, 2008.

STEELE, H. L.; JAEGER, K-E.; DANIEL, R.; STREIT, W. R. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenome. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 25-37, 2009.

STROPA, K. C. **Enumeração celular pela quantificação absoluta por PCR em tempo real de culturas de bradirrizóbios**. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2009.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TORSVIK, V. GOKSOYR, J. DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

TURNBAUGH, P. J.; GORDON, J. L. An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 708-713, 2008.

VAL-MORAES, S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, L. M. C. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

VON MERING, C.; HUGENHOLTZ, P..; TRINGE, S. G.; DOERKS, T.; JENSEN, L. J.; WARD, N.; BORK, P. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. **Science**, v. 315, n. 5815, p. 1126-1130, 2007.

WARD, B. B. How many species of prokaryotes are there? **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, n. 16, p. 10234-10236, 2002.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p.737-738, 1953.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p.221-271, 1987.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**. v. 15, n. 7, p. 1713-1731, 2006.