



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATO  
GROSSO  
CAMPUS CUIABÁ - BELA VISTA  
DEPARTAMENTO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**ROBERTA DAMIÃ MELO ALVES**

**MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE ESPÉCIES DA  
MICROBIOTA DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO**

**Cuiabá – MT  
2019**



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATO  
GROSSO  
CAMPUS CUIABÁ - BELA VISTA**

**DEPARTAMENTO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU, EM NÍVEL DE ESPECIALIZAÇÃO,  
EM INOVAÇÃO E EMPREENDEDORISMO PARA NEGÓCIOS SUSTENTÁVEIS**

**ROBERTA DAMIÃ MELO ALVES**

**MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE ESPÉCIES DA  
MICROBIOTA DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Pós-Graduação Lato Sensu, em Nível de Especialização, em Inovação e Empreendedorismo para Negócios Sustentáveis do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá - Bela Vista.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr. Sandra Mariotto

**Cuiabá – MT  
2019**

**Divisão de Serviços Técnicos. Catalogação da Publicação na Fonte. IFMT Campus  
Cuiabá Bela Vista  
Biblioteca Francisco de Aquino Bezerra**

A474m

Alves, Roberta Damiã Melo

Marcadores moleculares para detecção de espécies da microbiota do solo do cerrado brasileiro. / Roberta Damiã Melo Alves. \_Cuiabá, 2019. 18f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Mariotto

TCC (Especialização em Inovação e Empreendedorismo para Negócios Sustentáveis)\_. Programa de Pós-graduação. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

1. Biotecnologia aplicada – TCC. 2. Bactérias – TCC. 3. Oligonucleotídeos - TCC. I. Mariotto, Sandra. II. Título.

IFMT CAMPUS CUIABÁ BELA VISTA

CDU 631.4(251.3)  
CDD 631.46

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**ROBERTA DAMIÃ MELO ALVES**

**MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE ESPÉCIES DA  
MICROBIOTA DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO**

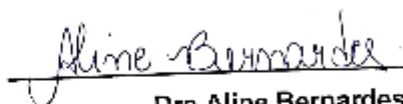
Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-Graduação Lato Sensu, em Nível de Especialização, em Inovação e Empreendedorismo para Negócios Sustentáveis, submetido à Banca Examinadora composta pelos Professores convidados e do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Especialista.

Aprovado em 25 de Junho de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**



**Dra Sandra Mariotto**  
**Professor Orientador – IFMT**



**Dra Aline Bernardes**  
**Professor Convidado - IFMT**



**Dr Jorge Luiz da Silva**  
**Professor Convidado – IFMT**

**Cuiabá – MT**  
**2019**

## **DEDICATÓRIA**

À Deus,

Por me dar forças e sabedoria na construção desse artigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao corpo docente do IFMT, Campus Cuiabá Bela Vista, por me fazer trilhar os caminhos do conhecimento.

A minha orientadora Sandra Mariotto, que me inspira a ser, o melhor que eu possa ser. Fonte de inspiração diante de seu conhecimento, inteligência e humanidade. “Professora, acha que essa quantidade de Taq Polimerase dá para fazer mais uma PCR?” – “Nossa! isso aí dá para fazer umas 50 PCRs”.

A minha parceira nerd Gioavanna Camolezzi, pela preciosa colaboração em tudo que foi desenvolvido via computador.

A prof Dra Aline Bernardes pelas contribuições.

Ao professor Dr Jorge Silva por me ajudar a construir o projeto que se tornou este artigo. Com seu “jeitinho morde e assopra”.

Aos meus amigos que estiveram por perto me auxiliando de alguma forma, seja no assunto “artigo” ou no assunto “coisas da vida” diante desse período de ansiedades pré artigo.

A minha família, pai e mãe, mas em especial minha amada vizinha dona Maria de Lourdes Alves, por dar significado para minha vida.

## RESUMO

Marcadores moleculares são elementos de extrema sensibilidade e eficácia em uma reação de PCR, de modo a economizar tempo, recursos, e obter através de sua utilização, precisão e confiabilidade nas análises. O Bioma Cerrado é um imenso refugio ecológico, onde sua microbiota nativa, ainda pouco explorada, pode oferecer novas aplicações biotecnológicas. Nesse contexto, presente estudo objetivou desenhar e testar quatro *primers* para auxiliar na identificação rápida de microrganismos. Foram analisados DNAs de amostras bacterianas de quatro parques de Cuiabá-MT, utilizadas para o sequenciamento e seleção das espécies. A partir das sequências obtidas e as disponíveis no GenBank, foram desenhados os quatro primers para as espécies: *Acinetobacter soli*, *Pseudomonas* sp., *Lysinibacillus varians* e *Rhodanobacter thiooxydans*. Os resultados demonstraram que a eficiência desses biomarcadores moleculares foi expressiva com 91,66% para *Acinetobacter soli* e *Pseudomonas* sp., enquanto os outros dois *primers* não anelaram conforme esperado, apesar de sua capacidade testada nos programas de bioinformática. Diante do atual cenário de devastação em solos do bioma Cerrado, conhecer sua microbiota nativa visando possíveis aplicações biotecnológicas é de suma importância.

Palavras- chave: Biotecnologia aplicada; Bactérias; Oligonucleotídeos.

## ABSTRACT

Molecular markers are elements of extreme sensitivity and efficiency in a reaction of PCR, as a way of saving time, resources and to obtain, through its use, precision and reliability in analysis. The Cerrado Biome is a huge ecological refuge, where its native microbiota, still underexplored, can offer new biotechnological applications. Therefore, this research has as aim to draw and to test primers to help in the fast identification of microorganisms; DNAs of bacterial samples were analyzed of four parks of Cuiabá-MT, used to the sequencing and to the selection of species. From the obtained sequences and the available in the GenBank, four primers were drawn to the species: *Acinetobacter soli*, *Pseudomonas* sp., *Lysinibacillus varians* e *Rhodanobacter thiooxydans*. The results showed that the efficiency of these molecular biomarkers was expressive with 91,66% to *Acinetobacter soli* and *Pseudomonas* sp., while the other two primers did not yearn as expected, in spite of its capacity been tested in programs of bioinformatics. Facing the current scenario of devastation in soles of Cerrado Biome, to know its native microbiota aiming possible biotechnological applications is of fundamental importance.

Keywords: Applied Biotechnology; Bacteria; oligonucleotide.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>17</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>17</b>



## **CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU, EM NÍVEL DE ESPECIALIZAÇÃO, EM INOVAÇÃO E EMPREENDEDORISMO PARA NEGÓCIOS SUSTENTÁVEIS**

### **MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE ESPÉCIES DA MICROBIOTA DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO**

DAMIÃ, ROBERTA  
CAMOLEZZI, GIOVANNA  
BERNARDES, ALINE  
MARIOTTO, SANDRA

#### **1. INTRODUÇÃO**

A vida do solo é substancialmente representada pelos micróbios existentes e suas atividades desempenhadas. Preservar este recurso é essencial para qualidade de vida humana, através dos serviços ecossistêmicos que os solos desempenham, para garantir vida presente e futura (WALL et al., 2019).

O desenvolvimento de abordagens independentes de cultivo de bactérias dos solos, como as abordagens moleculares, traz uma nova perspectiva em prol de explorar a vasta diversidade de comunidades microbianas, com rapidez e confiabilidade (KOWALSKA; PNIEWSKI; LATAIA, 2019). O isolamento e identificação de microrganismos em fragmentos de solos tem sido útil para obtenção de estirpes geneticamente estáveis (ADNAN; TAN, 2007). Uma grande parcela dos produtos naturais que possuem valor econômico agregado é derivada de microrganismos do solo, de extrema importância econômica, social e ambiental (DANIEL, 2004); e estudos metagenômicos de microrganismos podem identificar uma vasta diversidade, facilitando as comparações entre microbiomas e proporcionando resultados científicos expressivos (FIERER, 2017).

Uma pesquisa no Central Park (EUA) demonstrou que esse único fragmento urbano, possui uma biodiversidade microbiana, semelhante à junção de vários fragmentos espalhados pelo mundo, isso ressalta a importância de estudos relacionados a saúde e preservação dos solos de modo a manter em equilíbrio as comunidades microbianas existentes (RAMIREZ et al., 2014).

Estudos evidenciam a importância de se manter a vegetação nativa dos solos do cerrado, pois a diversidade de microrganismos encontrados em solo de mata nativa pode chegar a ser dez vezes superior a riqueza de espécies em relação a um solo de pastagem (QUIRINO et al., 2009). As ações antrópicas, causam perturbações às comunidades bacterianas atuando como instrumentos de seleção e redução da biodiversidade local (GAINSBURY; COLLI, 2019).

O estudo da diversidade de microrganismos do cerrado pode desvendar o efeito da perturbação no ecossistema, e descobrir novos táxons com potencial para aplicações biotecnológicas e principalmente, analisar a diversidade microbiana nestes ecossistemas para compreender a distribuição das comunidades (SCHENBERG, 2010). Mudanças nas características de propriedades do solo, geralmente são medidas através de análises nos atributos físicos, químicos e biológicos; e, a abundância microbiana é fator de extrema importância para saúde de fragmentos urbanos, podendo relacioná-los diretamente com o grau de perturbação ecossistêmica (BAO et al., 2019).

Isoladamente, microrganismos decompositores de uma só espécie não são bioquimicamente versáteis, limitando-se a degradar alguns tipos de estruturas biológicas, no entanto, é a diversidade de microrganismos envolvida no processo de decomposição que permite que espécies diferentes consigam quebrar estruturas bioquimicamente mais complexas (COLEMAN; CROSSLEY; HENDRIX, 2004).

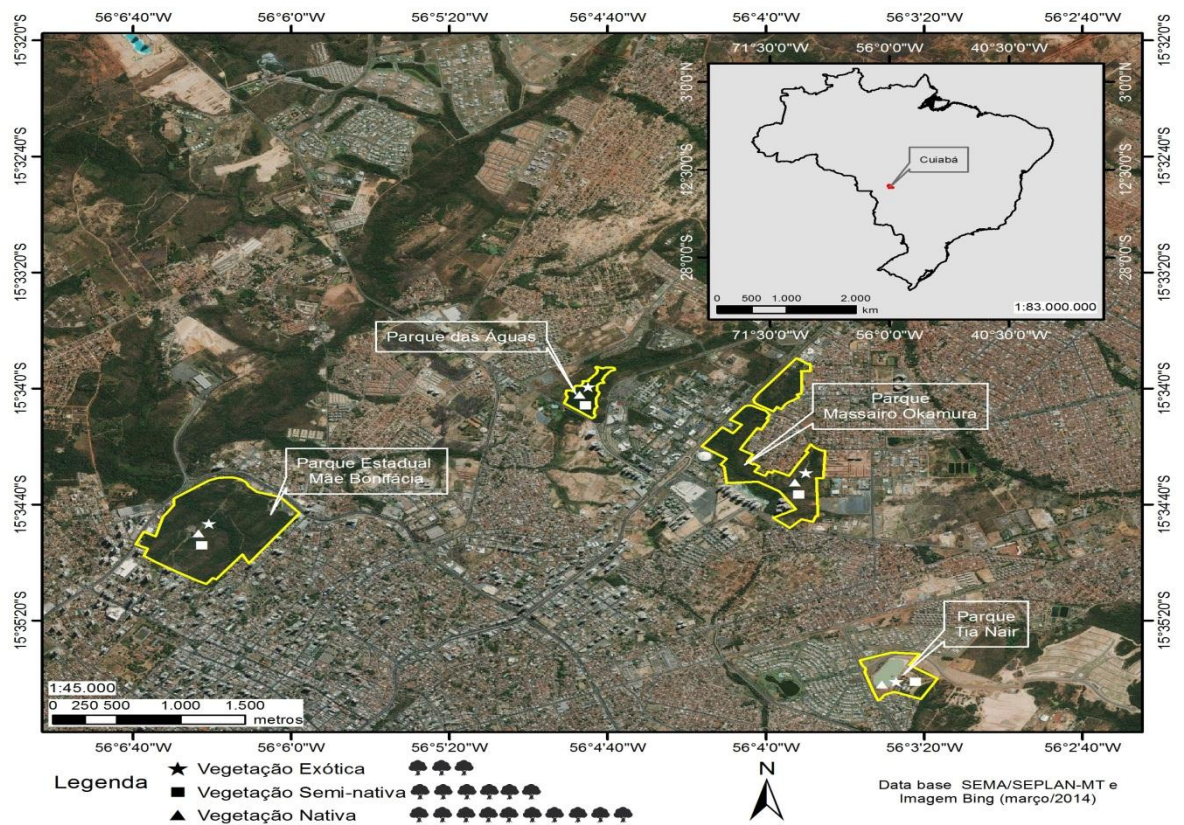
O grande gargalo dos estudos em microbiologia do solo, foi entender que havia discrepância entre o número de bactérias cultiváveis e a existência daquelas não cultiváveis (FIERER, 2017); situação essa, esclarecida com os estudos metagenômicos, conectando genética do solo com tudo aquilo que é expresso pelos microrganismos em relação as suas funções desempenhadas (JANSSON; HOFMOCKEL, 2018).

Os biomarcadores moleculares são elementos essenciais e de alta complexidade em uma reação de PCR (Polimerase Chain Reaction), devido a sua especificidade e sensibilidade, são eles que dão robustez para a reação, fornecendo resultados confiáveis (KOWALSKA; PNIEWSKI; LATAIA, 2019), desde que seu designer contenha um mínimo de dímeros de *primers* e sua temperatura de anelamento seja a ideal para a sequência de oligonucleotídeos desenvolvida (BUSTIN; HUGGETT, 2017).

Com a utilização de *primers* espécie-específicos as análises podem ser feitas de forma a otimizar tempo, especialmente quando se trata de patógenos, sendo necessários resultados imediatos (SILVEIRA NETO et al., 2012; PASTRO et al, 2018). Nesse aspecto, e não localizados *primers* espécie-específicos para bactérias dos solos do Bioma Cerrado, esta pesquisa foi realizada a fim de desenhar e testar quatro *primers* que podem auxiliar na identificação rápida de microrganismos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados nos parques: Tia Nair, Parque das Águas, Mãe Bonifácia e Parque Massairo Okamura, (figura 1).



**Figura 1:** Mapeamento dos pontos amostrados. Fonte: Resultados da pesquisa.

Foram realizadas duas coletas de amostra de solos, sendo uma na estação seca no início de setembro de 2017 e outra na estação chuvosa no final de outubro de 2017. A extração de DNA total foi realizada com a associação de distintos protocolos: Aljanabi & Martinez (1997), Junqueira e Silveira (2010) e Sambrook et al., 1989). Para a amplificação dos fragmentos dos genes 16S rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 968 Forward AAC GCG AAG AAC CTT AC e 1401 Reverse CGG TGT GTA CAA GAC CC (Nubel et al., 1996). Para a PCR, o mix foi composto por: 12,5µl One Taq hot start 2xMM w/std Buffer Biolabs, 10µl de Água Miliq, 0,5µl de cada *primer*, 1µl BSA (Albumina de soro bovino) e 1,5µl do DNA da amostra para compor os 25µl do volume final em cada microtubo de PCR. Foram 33 passos de amplificação sob temperaturas 95°C 5'; 95°C 45"; 55°C 45", 72°C 1'; 72°C 7'; 4°C. Para a construção dos *primers*, (tabela 1) foram usadas sequências de genes do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Após o desenho dos *primers*, a partir das sequências disponíveis no GenBank e das sequências novas, estas foram editadas e submetidas a uma análise estrutural através do software OligoAnalyzer 3.1; no NCBI, através da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foram alinhados os *primers* com as sequências. Os biomarcadores foram testados e avaliados quanto sua especificidade de amplificação através da PCR. As PCRs dos *primers* espécie específicos seguiram os mesmos passos descritos para os *primers* de 16S rDNA. Após a amplificação, os produtos foram testados em gel de eletroforese a 1,5%, corados com 1 µl de *Blue Juice* (10x) e 0,1 µl de GelRed® (Biotium), acompanhados de 3 µl de DNA Ladder 100kb (Kasvi).

### 3. RESULTADOS

Um total de 24 amostras do gene 16S rDNA tiveram suas sequências satisfatórias para obtenção das principais espécies de ocorrência nos solos analisados. Os gêneros e espécies bacterianas com maior grau de identidade genética encontrados foram: *Acinetobacter soli* (Aci); *Pseudomonas* sp. (Pseud); *Lysinibacillus varians* (Lyva) e *Rhodanobacter thiooxydans* (Rhott). Os *primers* criados a partir dessas sequências estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1** Sequências dos *primers* gêneros e espécie-específicos desenhados.

Nome do primer	Tipo	Sequência (5' – 3') <sup>a</sup>	Posição de anelamento	Orientação
<i>Acinetobacter soli</i>	Aci	GACGATCTGTAGCGGGTCTG	251-270	Forward
<i>Acinetobacter soli</i>		AAGAGCCTCCTCCTCGCTTA	367-386	Reverse
<i>Pseudomonas</i> sp	Pseud	ATTAAGTTGACCGCCTGGGG	466-485	Forward
<i>Pseudomonas</i> sp		ATCACACCGTGGTAACCGTC	1336-1355	Reverse
<i>Lysinibacillus varians</i>	Lyva	AGGCAACGATGCGTAACCC	106-124	Forward
<i>Lysinibacillus varians</i>		CTGGCAGGTAGTTAGCCGTG	334-353	Reverse
<i>Rhodanobacter thiooxydans</i>	Rhot	ATCGAGACCGAAGACGATGC	812-822	Forward
<i>Rhodanobacter thiooxydans</i>		TCCAATCCGTCGTGTTCCAG	1276-1282	Reverse

Fonte: Resultados da pesquisa.

O anelamento dos *primers* *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter soli* foi satisfatório em 91,66% das amostras. Os *primers* *Lysinibacillus varians* e *Rhodanobacter thiooxydans*, apesar de vários testes e alterações de protocolo não anelaram.

As espécies do gênero *Pseudomonas* foram testadas com PCR controle, através da espécie *P. aeruginosa*, cepa pura (CBAM 0679). Apesar dos contatos e esforços, as instituições com bibliotecas de microrganismos não possuem estirpes puras para a maioria das espécies que ocorrem naturalmente nos solos; e por isso, não foi possível fazer PCRs com controle positivo, apenas com controles negativos.

#### 4. DISCUSSÃO

Segundo Kowalska e colaboradores (2019), com o advento da biologia molecular foi possível ter amplitude do quão grande é o número de bactérias que podem ser identificadas mais rapidamente (FIERER, 2017), baseado nisso, foram desenhados *primers* de quatro bactérias dos solos de parques urbanos, marcadores moleculares que permitiram identificar rapidamente espécies bacterianas dos solos do cerrado.

A partir dos resultados encontrados, os *primers* Aci GenBank: BBNM01000001.1 obteve alta amplificação das amostras, de um total de 24 possibilidades, 24 foram positivas; o biomarcador molecular para Aci foi o mais eficiente entre todos desenvolvidos, com amplificação de 100% das amostras dos quatro parques urbanos de Cuiabá-MT; a presença dessa bactéria nesses solos é um indicador de equilíbrio ambiental, já que esse gênero geralmente se desenvolve em solos de florestas; possui importante aplicação biotecnológica, através de potencial de degradação de petróleo e seus derivados (KIM et al., 2008).

*Pseudomonas* sp. GenBank: Y927414.1 são utilizadas para biooxidação do gás sulfeto, inclusive em altas concentrações (XU et al., 2016); suas cepas são capazes de metabolizar via oxidação e via hidrolítica o composto endossulfan que é um pesticida organoclorado altamente tóxico e persistente no ambiente (ZAFFAR et al., 2018), seu marcador molecular obteve efetividade de 83,33% de amplificação, demonstrando a importância de se identificar solos que possuam essas bactérias.

O *primer* Lyva GenBank: KX011876.1 não se demonstrou efetivo, não ocorreu amplificação. Marcador este, que identifica bactérias biodegradadoras de contaminantes ambientais persistentes como o Éter Difenílico Bromado-BDE (ZHU C. et al., 2014), principalmente devido a sua baixa volatilidade e solubilidade em meios aquosos. A toxicidade dessa classe de compostos tem sido relacionados com alterações imunológicas, hepatotóxicas e neurotóxicas e até endócrinas (ANNUNCIACÃO et al., 2018).

O oligonucleotídeo desenhado para Rhot GenBank: QBUW01000007.1 não foram efetivos, mas vale ressaltar, que essas bactérias possuem importantes aplicações biotecnológicas sendo capazes de metabolizar o composto químico Tiosulfato, que se encontra presente na indústria de fármacos e utilizado também para branqueamento de papel (BUI et al., 2010).

A ausência de anelamento dessas sequências genéticas, talvez possa ser explicada, pelo fato das sequências bases depositadas e retiradas do site do GenBank para criação desses marcadores, terem sido das bactérias de outro continente, na China, com regiões de onde esses primers deveriam marcar, distintas das que encontramos no Bioma Cerrado. Existem diversos motivos não compatibilidade nas bases complementares para não ocorrer a amplificação de um iniciador: não compatibilidade nas bases complementares; efeito posicional do emparelhamento das fitas, (LEDEKER; LONG, 2013).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos dos microrganismos dos solos do Cerrado podem ter importantes aplicações biotecnológicas na saúde e meio ambiente. Detectar esses microrganismos de forma rápida e confiável ainda é um desafio tendo em vista os dados escassos sobre o genoma dos mesmos. Portanto, faz-se necessária ampliação de pesquisas do microbioma dos solos do Cerrado, especialmente diante da grande perda de sua área nativa que este tem sofrido ultimamente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNAN, A. F. M; TAN, I. K. P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n 7, p. 1380-1385, may 2007.

ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4692-4693, 1997.

ANNUNCIAÇÃO, DANIEL et al. ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS (PBDE) COMO CONTAMINANTES PERSISTENTES: OCORRÊNCIA, COMPORTAMENTO NO AMBIENTE E ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS. **Química Nova**, [s.l.], p.782-795, 2018. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170218>.

BAO, TIANLI et al. Effects of disturbance on soil microbial abundance in biological soil crusts on the Loess Plateau, China. **Journal Of Arid Environments**, [s.l.], v. 163, p.59-67, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.01.003>.

BUI, NAM & KIM, YEON-JU & KIM, HOBIN & YANG, DEOK-CHUN. (2010). *Rhodanobacter soli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **International**



**journal of systematic and evolutionary microbiology.** 60. 2935-9.  
10.1099/ijs.0.019422-0.

BUSTIN, STEPHEN; HUGGETT, JIM. QPCR primer design revisited. **Biomolecular Detection And Quantification**, [s.l.], v. 14, p.19-28, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>.

COLEMAN, DAVID C.; CROSSLEY, D.A.; HENDRIX, PAUL F.. Future Developments in Soil Ecology. **Fundamentals Of Soil Ecology**, [s.l.], p.271-298, 2004. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012179726-3/50009-5>.

DANIEL, ROLF. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.199-204, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.005>.

DUBEY, SURESH KUMAR; TRIPATHI, ANIL KUMAR; UPADHYAY, Siddh Nath. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 97, n. 17, p.2217-2224, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.008>.

FIERER, NOAH. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews microbiology**, v.15, p579-590, agosto. (2017). <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.87>.

GAINSBURY, ALISON MELISSA; COLLI, GUARINO RINALDI. Phylogenetic community structure as an ecological indicator of anthropogenic disturbance for endemic lizards in a biodiversity hotspot. **Ecological Indicators**, [s.l.], v. 103, p.766-773, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.03.008>.

JANSSON, JANET K; HOFMOCKEL, KIRSTEN S. The soil microbiome — from metagenomics to metaphenomics. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 43, p.162-168, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.013>.

KIM, DUWOON et al. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. **The Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.396-401, ago. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-008-0118-y>.

KOWALSKA, ZUZANNA; PNIEWSKI, FILIP; LATAŁA, ADAM. DNA barcoding – A new device in phycologist's toolbox. **Ecohydrology & Hydrobiology**, [s.l.], p.0-0, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecohyd.2019.01.002>.

LEDEKER, BRETT M.; LONG, SUSAN K. DE. The effect of multiple primer–template mismatches on quantitative PCR accuracy and development of a multi-primer set assay for accurate quantification of *pcrA* gene sequence variants. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 94, n. 3, p.224-231, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.013>.

PASTRO, D.C; MARIOTTO, S.; CERQUEIRA SANTOS, E.; FERREIRA, D.C.; CHITARRA, G.S. 2018. Use of molecular techniques for the analysis of the microbiological quality of fish marketed in the municipality of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Food Science and Technology** .

QUIRINO, BETANIA F. et al. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 164, n. 1, p.59-70, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2006.12.001>.

RAMIREZ, K. S. et al. Biogeographic patterns in below-ground diversity in New York City's Central Park are similar to those observed globally. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 281, n. 1795, p.20141988-20141988, 1 out. 2014. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1988>.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory.

SCHENBERG, ANA CLARA GUERRINI. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 24, n. 70, p.07-17, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142010000300002>.

SCHIMEL, JOSHUA P.; SCHAEFFER, SEAN M.. Microbial control over carbon cycling in soil. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 3, p.1-18, 2012. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00348>.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J.. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 3, p.1501-1506, 1 mar. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.3.1501-1506.2005>.

SIMON, CAROLA; DANIEL, ROLF. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 4, p.1153-1161, 17 dez. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02345-10>.

WALL, LUIS GABRIEL et al. Changes of paradigms in agriculture soil microbiology and new challenges in microbial ecology. **Acta Oecologica**, [s.l.], v. 95, p.68-73, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actao.2019.02.001>.

XU, XI-JUN et al. Characterization of a newly isolated strain *Pseudomonas* sp. C27 for sulfide oxidation: Reaction kinetics and stoichiometry. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-10, 11 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep21032>.

ZAFFAR, HABIBA et al. A newly isolated *Pseudomonas* sp. can degrade endosulfan via hydrolytic pathway. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 152, p.69-75, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.09.002>.

ZHU, C;SUN, G; CHEN, X; GUO, J; XU, M. ( 2014 ; ) *Lysinibacillusvarians* sp. nov., uma bactéria formadora de endósporos com um ciclo celular de filamento a bastonete. . **Int J Syst Evol Microbiol** 64 :, 3644- 3649 .