

**MAICON RICARDO ZIEBERG PASSINI**

**APERFEIÇOAMENTO DE UMA TÉCNICA PARA EXTRAIR DNA DE ÁGUA  
DO MAR E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA NA  
CARACTERIZAÇÃO DE UMA COMUNIDADE BACTERIANA MARINHA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantã/IPT do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO  
2015

## RESUMO

PASSINI, M. R. Z. **Aperfeiçoamento de uma técnica para extrair DNA de água do mar e comparação de métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha.** 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os micro-organismos marinhos são os maiores pilares para a vida na Terra, sendo responsáveis por funções nos ciclos biogeoquímicos que nenhum outro organismo é capaz de realizar. Os seus produtos metabólicos podem ser utilizados em aplicações biotecnológicas e é essa a principal força motriz para estudá-los. Com as limitações das técnicas de cultivo, tornou-se necessário caracterizar molecularmente os recursos microbianos. Entretanto, como estes estudos são realizados a partir do DNA, podemos encontrar distintos resultados dependendo do DNA utilizado. Assim, essa pesquisa buscou aperfeiçoar uma técnica para extrair DNA de água do mar de modo que resultasse em DNA de boa qualidade, com alto rendimento e de forma rápida. Além disso, para demonstrar a importância dos métodos de extração de DNA no estudo dos micro-organismos por métodos independentes de cultivos, foi caracterizada, pela técnica de DGGE, a diversidade de uma comunidade bacteriana marinha usando diferentes métodos de extração de DNA. Inicialmente, foi realizado o aperfeiçoamento das etapas em uma metodologia de extração de DNA de água: processamento da amostra, lise celular, purificação e recuperação do DNA. Posteriormente, comparamos cinco métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha por DGGE. O aperfeiçoamento da metodologia de extração de DNA de água do mar resultou em um protocolo com a qualidade do DNA similar à do protocolo original, com rendimento melhor e aproximadamente quatro vezes mais rápido que o protocolo inicialmente descrito. Em relação à caracterização da comunidade, verificamos, distintos perfis da comunidade microbiana marinha, não somente em relação à presença e ausência das bandas de DNA no DGGE, mas também em relação à intensidade destas. No entanto, não observamos diferenças significativas entre riqueza e diversidade. Comparando as metodologias, vimos que a maioria das OTUs foi encontrada em todas as metodologias de extração de DNA, porém OTU exclusivas foram vistas, demonstrando que as técnicas de extração podem favorecer a detecção de algumas espécies.

**Palavras-chave:** Extração de DNA de água do mar. Ecologia molecular microbiana. Micro-organismos marinhos. DGGE.

## ABSTRACT

PASSINI, M. R. Z. **The improvement of a technique for seawater DNA extracting and the comparison of DNA extraction methods for the characterization of a marine bacterial community.** 2015. 91 f. Dissertação (Masters thesis Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Marine microorganisms are the major pillars for life on Earth, since they are responsible for roles in biogeochemical cycles that no other organism can perform. Their metabolic products can be used in biotechnological applications and this is one of the main driving force to study them. With the limitations of culture-based techniques, it has become necessary to use molecular techniques to better characterize microbial genetic resources. However, these studies are done using directly environmental DNA, and therefore we can find different results depending on the methodology chosen for the DNA extraction. Thus, this study aimed to improve a technique for extracting DNA from sea water, in order to obtain a high quality DNA, high yield and a low time consuming protocol. Furthermore, to demonstrate the importance of the DNA extraction methods in the study of microorganisms by cultivation-independent methods, the diversity of a marine bacterial community was characterized by DGGE technique using different methods of DNA extraction. Initially, it was performed the improvement of different steps of the methodology of DNA extraction from water: sample processing, cell lysis, purification and recovery of DNA. Later, we compared five methods of DNA extraction for the characterization of a marine bacterial community by DGGE. The improved methodology of DNA extraction from seawater resulted in a protocol similar in DNA quality, with better yield and approximately four times faster than the protocol initially described. Regarding the characterization by different DNA extraction protocols, the analysis by DGGE resulted in distinct marine microbial community profiles, not only with respect to the presence or absence of DNA bands, but also to their intensity. However, was not observed significant differences in richness and diversity among the methodologies. Comparing the extraction methods, most of the OTUs were found in all methodologies, however, unique OTUs were found, demonstrating that the extraction techniques may cause bias toward the observation of some species.

**Keywords:** DNA extraction from seawater. Molecular microbial ecology. Marine microorganisms. DGGE.

## 1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 71% da superfície do nosso planeta está coberta pelos oceanos. O Brasil, sendo um país de proporções continentais, possui o mais extenso litoral inter e subtropical do mundo, apresentando ecossistemas marinhos únicos e praticamente inexplorados (AB´SABER, 2005). É no ambiente marinho que se encontra o maior reservatório de organismos da Terra, sendo a grande maioria destes composta pelos mais antigos e mais abundantes organismos do planeta, as bactérias (COLWELL, 1997).

As bactérias são micro-organismos com imensa diversidade, rápido crescimento e variabilidade genética (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Sua presença é fundamental para o equilíbrio da vida no planeta, pois são os principais envolvidos nos ciclos biogeoquímicos, reciclando a matéria e fornecendo condições de vida para outros seres vivos (AZAM, 1998; MYERS, 1996). Economicamente, estão relacionadas com diversas áreas como agricultura, biolixiviação, produção de alimentos, compostos bioativos e no tratamento de áreas impactadas (biorremediação). Esse potencial biotecnológico dos micro-organismos proporciona um desenvolvimento econômico sustentável e, por isso, é importante estudá-los e preservá-los (COLWELL, 1997; HUNTER–CEVERA, 1998; RIVERA; PAULA; SOUZA, 2008).

Embora as bactérias apresentem essa infinidade de papéis, elas continuam sendo subexploradas. Isto porque, durante muito tempo, os estudos se concentraram apenas nos organismos cultiváveis, que representam cerca de 1% do total (COLWELL, 1997; TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Os avanços nas técnicas moleculares possibilitaram o estudo dos micro-organismos sem a necessidade de cultivá-los, e isso fez com que as pesquisas envolvendo a diversidade microbiana aumentassem nos últimos anos.

Dentre as técnicas moleculares para caracterizar os organismos estão os métodos de *fingerprinting*, tal como a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE). O DGGE, associado com a reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene 16S RNAr vem sendo utilizado para estudar a diversidade nos domínios Bacteria (THOMPSON, 2014) e Archaea (ZHANG, 2014).

Entretanto, o DGGE apresenta os vieses das técnicas que se baseiam no DNA para caracterizar os organismos e que podem levar a distintos resultados dependendo de como foi realizada a coleta e transporte das amostras, do protocolo escolhido para extração de DNA, das condições determinadas para realizar a reação em cadeia da polimerase e até mesmo das

análises dos dados, onde os pesquisadores utilizam seus *softwares* e critérios preferidos (INCEOGLU et al., 2010; OSBORNE et al., 2005).

Uma das maneiras para diminuir as variações nas análises da diversidade por métodos independentes de cultivo é utilizarmos o DNA representativo de toda a comunidade a ser estudada (INCEOGLU et al., 2010; TANG et al., 2009). No entanto, realizar a extração de DNA de origem ambiental é um desafio, pois há distintas características nos micro-organismos e nas amostras. Essa dificuldade é o principal motivo para o desenvolvimento de novas metodologias e *kits* comerciais de extração.

Assim, este estudo buscou fornecer uma nova opção para extrair DNA de água do mar, e comparar, por DGGE, o efeito de diferentes métodos de extração na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 Aperfeiçoamento de uma técnica para extrair DNA de água do mar

- Esse estudo aprimorou a metodologia de extração de DNA de água do mar descrita por Rivera et al. (2003), resultando em um protocolo que manteve a qualidade do DNA e agregando as vantagens de ser realizado em menor tempo e com maior rendimento de DNA.
- Extraíndo-se o DNA da água do mar pelo protocolo aperfeiçoado, ocorre um aumento proporcional do rendimento à medida que mais água é filtrada.
- Ao compararmos as diferentes metodologias de extração de DNA verificamos que:
  - Em relação à concentração do DNA obtido, o protocolo aperfeiçoado apresentou o melhor rendimento, sendo os *kits* comerciais os que tiveram os valores mais baixos.
  - Quanto à qualidade do DNA observada pelas razões  $A_{260/230}$  e  $A_{260/280}$ , as técnicas de Rivera et al. (2003) e o protocolo aperfeiçoado apresentaram melhores resultados que os *kits* comerciais.
  - Quanto ao tempo de execução, os *kits* comerciais são os mais rápidos (30min), no entanto, o protocolo aperfeiçoado pode ser executado em 1h e 20min, aproximadamente quatro vezes mais rápido que o inicialmente descrito (5h).

### 6.2 Comparação entre diferentes métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha por DGGE

- O uso de distintos protocolos de extração de DNA de água do mar resultou em diferentes perfis da comunidade microbiana marinha no DGGE, não somente em relação à presença e ausência das bandas de DNA, mas também em relação à sua intensidade relativa.
- Comparando a mesma metodologia de extração de DNA pelos dois volumes utilizados (100 mL e 400 mL), observamos que a maioria das OTUs é compartilhadas e as exclusivas são vistas tanto no volume menor como no maior.

➤ A maioria das OTUs observadas foi encontrada em todas as metodologias de extração. No entanto algumas foram observadas em apenas determinadas metodologias, corroborando com o fato já conhecido de que as técnicas de extração podem favorecer a detecção de algumas espécies.

➤ Mesmo utilizando metodologias de extração que resultaram em DNA com distintas concentrações e qualidades, não observamos diferenças significativas de riqueza e diversidade entre as metodologias testadas.

## REFERÊNCIAS\*

- AB´SABER, N. A. **O Litoral do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Metalivros, 2005. 281 p.
- AGOGUÉ, H.; BRINK, M.; DINASQUET, J.; HERNDL, G. J. Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. **Nature**, v. 456, p. 788-791, 2008.
- AHMAD, S. M.; GANAIE, M. M.; QAZI, P. H.; VERMA, V.; BASIR, S. F.; QAZI, G. N. Rapid DNA isolation protocol for angiospermic plants. **Bulg. J. Plantphysiol.**, v. 30, n. 1-2, p. 25-33, 2004.
- ALEKSIC, J. M.; STOJANOVIC, D.; BANOVIC, B.; JANCIC, R. A Simple and Efficient DNA Isolation Method for *Salvia officinalis*. **Biochem. Genet.**, v.50, p. 881-892, 2012.
- ALLERS, A.; WRIGHT, J. J.; KONWAR, K. M.; HOWES, C. G.; BENEZE, E.; HALLAM, S. J.; SULLIVAN, M. B. Diversity and population structure of Marine Group A bacteria in the Northeast subarctic Pacific Ocean. **ISME J.**, v. 7, n. 2, p. 256-268, 2013.
- ALMEIDA, B. C. **Diversidade de bactérias em amostras de água do mar no canal de São Sebastião**. 2009. 198 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ALVES, F.; KÖCHLING, T.; LUZ, J.; SANTOS, S. M.; GAVAZZA, S. Water quality and microbial diversity in cisterns from semiarid areas in Brazil. **Journal of Water and Health**, Jan. 2014. Disponível em: < <http://www.iwaponline.com/jwh/up/wh2014139.htm> > Acesso em: 21 jun. 2014.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ARAVINDRAJA. C.; VISZWAPRIYA, D.; KARUTHA, P. S. Ultradeep 16S RNAr Sequencing Analysis of Geographically Similar but Diverse Unexplored Marine Samples Reveal Varied Bacterial Community Composition. **Plos one**, v. 8, n. 10, p. e76724, 2013.
- ARIEFDJOHAN, M. W.; SAVAIANO, D. A.; NAKATSU, C. H. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. **Nutr. J.** v. 9, n. 23, May, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492702> >/. Acesso em 20 Jun. 2014.
- AZAM, F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. **Science**, v. 280, p. 694-696, 1998.

---

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.



BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 3. ed. Campinas: Unicamp, 2007. 97 p.

BILGIN, D. D.; DeLUCIA, E. H.; CLOUGH, S. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. **Nat. Protoc.**, v. 4, n. 3, p. 333-340, 2009.

BOSTRÖM, K. H.; SIMU, K.; HAGSTRÖM, Å.; RIEMANN, L. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. **Limnol. Oceanogr.**, v. 2 p. 365–373, 2004.

BÜRGMANN, H.; PESARO, M.; WIDMER, F.; ZEYER, J. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. **J. Microbiol. Meth.**, v. 45, p. 7-20, 2001.

CABEEN, M. T.; WAGNER, C. J. Bacterial cell shape. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 601-610, 2005.

CAI, H.; ARCHAMBAULT, M.; PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 15, p. 465-469, 2003

CARLOS, C.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Sci. Rep.**, v. 3, p. 1624 – 1631, 2013.

CARRIGG, C.; RICE, O.; KAVANAGH, S.; COLLINS, G.; O'FLAHERTY, V. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 77, p. 955–964, 2007.

CHEN, T.; WANG, M.; LI, S.; WU, Q.; WEI, H. Molecular Identification of Microbial Community in Surface and Undersurface Douchi During Postfermentation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. 653-658, 2014.

CILIA, V.; LAFAY, B.; CHRISTEN, R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. **Mol. Biol. Evol.**, v. 13, p. 451-461, 1996.

CLAESSON, M. J.; WANG, Q.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; COLE, J.R.; O'TOOLE, P.W. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S RNAr gene regions. in: **Nucleic Acids Res.** v. 38, n. 22, p. e200, 2010.

CLEMENTINO, M. M.; FERNANDES, C. C.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; POLYCARPO, C. R.; MARTINS, O. B. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, n. 1, p. 141-51, 2007.

COLWELL, R. R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18 p. 302-307, 1997.

CORINALDESI, C.; DANOVARO, R.; DELL'ANNO A. Simultaneous Recovery of Extracellular and Intracellular DNA Suitable for Molecular Studies from Marine Sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 1, p. 46-50, 2005.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Microbiology. Exploring microbial diversity – a vast below. **Science**, v. 309, p. 1331-1333, 2005.

CURY, J. C.; ARAUJO, F. V.; COELHO-SOUZA, S. A.; PEIXOTO, R. S.; OLIVEIRA, J. A. L.; SANTOS, H. F.; DÁVILA, A. M. R.; ROSADO, A. S. Microbial Diversity of a Brazilian Coastal Region Influenced by an Upwelling System and Anthropogenic Activity. **Plos one**, v. 6, n. 1, p. e16553, 2011.

DAN, D.; ZHANG, D.; LIU, W.; LU, C.; ZHANG, T. Diversity Analysis of Bacterial Community from Permafrost Soil of Mo-he in China. **Indian J. Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 111-113, 2014.

DANIEL, I.; OGER, P.; WINTER, R. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, p. 858-875, 2006.

DE CORTE, D.; YOKOKAWA, T.; VARELA, M. M.; AGOGUÉ, H, G. J. Spatial distribution of Bacteria and Archaea and *amoA* gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea. **ISME J.**, v. 3, p. 147–158, 2009.

De LIPTHAY, J. R.; ENZINGER, C.; JOHNSEN, K.; AAMAND, J.; SORENSEN, S. J. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Biol Biochem.**, v. 36, n. 10, p. 1607-1614, 2004.

DÍEZ-VIVES, C.; GASOL, J. M.; ACINAS, S. G. Evaluation of Marine Bacteroidetes-Specific Primers for Microbial Diversity and Dynamics Studies. **Microb. Ecol.**, v. 64, n. 4, p. 1047 – 1055, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 191, p. 11-15, 1987.

DRAGO, L.; TOSCANO, M.; RODIGHIERO, V.; DE VECCHI, E.; MOGNA, G. Cultivable and pyrosequenced fecal microflora in centenarians and young subjects. **J Clin Gastroenterol.**, v. 46, p. 81-84, 2012.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; RICE, E.W.; GREENBERG, A. E.; FRANSON, M. A. H. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington: American Public Health Association, 2005. 1368 p.

EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H. D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **Eur. J. Biochem.**, v. 47, p. 91-97, 1974.

EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLÖCKNER, F.O.; AMANN, R. Culturability and In Situ Abundance of Pelagic Bacteria from the North Sea. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 7, p3044-3051, 2000.

FEINSTEIN, L.M.; SUL, W. J.; BLACKWOOD, C.B. Assesment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75. n. 16, p. 5428-5233, 2009.

FERRER, M.; BELOQUI, A.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Metagenomics for mining new genetic resouces of microbial communities. **J.Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 16, p. 109-123, 2009.

FINLAY, B. J.; MABERLY, S. C.; COOPER, J. I. Microbial diversity and ecosystem function. **Oikos.**, v. 80, p. 209-213, 1997.

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophore- sis. **Cell**, v. 16, n. 1, p. 191–200, 1979.

FRIAS-LOPEZ, J.; SHI, Y.; TYSON, G. W.; COLEMAN, M. L.; SCHUSTER, S. C.; CHISHOLM, S. W. Microbial community gene expression in ocean surface waters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 105, p. 3805–3810, 2008.

FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAIN-MISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. **Environ. Microbiol.**, v. 4, p. 634-643, 2002.

FUHRMAN, J. A.; COMEAU, D. E.; HAGSTROM, A.; CHAN, A. M. Extraction from Natural Planktonic Microorganisms of DNA Suitable for Molecular Biological Studies. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, n. 6, p. 1426-1429, 1988.

GANESH, S.; PARRIS, D. L.; DeLONG, E.; STEWART, F. J. Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. **ISME J.**, v. 8, p. 187-211, 2013.

GARBOR, E. M.; VRIES, E. J. de, JANSSEN, D. B. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 44 p. 153 – 163, 2003.

GIVENS, C. E.; BOWERS, J. C.; DEPAOLA, A.; HOLLIBAUGH, J. T.; JONES, J. L. Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*-potential roles for fish, oyster, sediment and water. **Appl. Microbiol.**, v. 58, n. 6, p. 503-10, 2014.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontol. Electron.**, v.4, n.1, p.1-9, May., 2001. Disponível em: <[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>. Acesso em 15 Jul. 2014.

HARDOIM, C. C. P.; COSTA, R.; ARAÚJO, F. V.; HAJDU, E.; PEIXOTO, R.; LINS, U.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D. Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 10, p. 3331- 3343, 2009.

HARPER, J. L.; HAWKSWORTH, D. L. Preface. In: HAWKSWORTH, D.L. Biodiversity, Measurement and Estimation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 29, n. 45 p. 5-12, 1994.

HARRINGTON, C.; DEL CASALE, A.; KENNEDY, J.; NEVE, H.; PICTON, B. E.; MOOIJ, M. J.; O'GARA, F.; KULAKOV, L. A.; LARKIN, M. J.; DOBSON, A. D. Evidence of bacteriophage-mediated horizontal transfer of bacterial 16S RNAr genes in the viral metagenome of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. **Microbiology**, v. 158, p. 2789-2795, 2012.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N.: **Ainsworth & Bibsy's. Dictionary of the Fungi**. 8. ed. Oxon: C.A.B. International Wallingford, 1995. 771 p.

HENDERSON, G.; COX, F.; KITTELMANN, S.; MIRI, V. H.; ZETHOF, M.; NOEL, S. J.; WAGHORN, G. C.; JANSSEN, P. H. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. **Plos one**, v. 8, n. 9, p. e74787, 2013.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: ELSAS, J.D.V.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Ed.) **Modern Soil Microbiology**, New York: Marcel Dekker, 1997, p. 353-373.

HUNTER-CEVERA J. C. The value of microbial diversity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 278-285, 1998.

HUNTER-CEVERA, J.; KARL, D.; BUCKLEY, M. **A Report from the American academy of microbiology marine microbial diversity: the key to earth's hability**. Washington, American Academy of Microbiology, 2005. Disponível em: <<http://academy.asm.org/images/stories/documents/marinemicrobialdiversity.pdf>>. Acesso em: 26/02/2015.

HURT, R. A.; QIU, X.; WU, L.; ROH, Y.; PALUMBO, A. V.; TIEDJE, J. M.; ZHOU, J. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 10, p. 4495-4503, 2001.

INCEOGLU, Ö.; HOOGWOUT, E. F.; HILL, P.; ELSAS, J.D.V. Effect of DNA Extraction Method on the Apparent Microbial Diversity of Soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 10, p. 3378-3382, 2010.

JOLLÈS, P. Recent development in the study of lysozymes. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 3, p. 28-36, 1964.

KENNEDY, N. A.; WALKER, A.W.; BERRY, S. H.; DUNCAN, S. H.; FARQUARSON, F. M.; LOUIS, P.; THOMSON, J. M.; SATSANGI, J.; FLINT, H. J.; PARKHILL, J.; LEES, C. W.; HOLD, G. L. The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S RNAr Gene Sequencing. **Plos one**, v. 9, n. 2, p. e88982. 2014.

KIRCHMAN, D. L.; YU, L.; FUCHS, B. M.; AMANN, R. Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. **Aquat. Microb. Ecol.**, v. 26, n. 1, p. 13-22, 2001.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil

- DNA used for microbial community fingerprinting. **Biol. Fert. Soils.**, v. 31, n. 5, p. 372-378, 2000.
- LANE, D. J. 16S/23S RNAr sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; OODFELLOW, M. 1. Ed. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991. 115–163 p.
- LEAR, G.; DONG, Y.; LEWIS, G. Microbiol. Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 567-571, 2010.
- LEE, O. O.; WANG, Y.; YANG, J.; LAFI, F. F.; AL-SUWAILEM, A.; QIAN, P-Y. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. **ISME J.**, v. 4, p. 650-664, 2010.
- LEFF, L. G.; DANA, J. R.; McARTHUR, J. V.; SHIMKETS, L. J. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 1141-1143, 1995.
- LEITE, D. C. A.; BALIEIRO, F. C.; PIRES, C. A.; MADARI, B. E.; ROSADO, A. S.; COUTINHO, H. L. C.; PEIXOTO, R. Comparison of DNA extraction protocols for microbial communities from soil treated with biochar. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 45, n. 1, Apr., 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822014000100023&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822014000100023&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 19 Aug. 2014.
- LEKUNBERRI, I.; GASOL, J. M.; ACINAS, S. G.; GÓMEZ-CONSARNAU, L.; CRESPO, B. G.; CASAMAYOR, E. O.; MASSANA, R. PEDRÓS-ALIÓ, C.; PINHASSI, J. The phylogenetic and ecological context of cultured and whole genome-sequenced planktonic bacteria from the coastal N W Mediterranean Sea, **Syst. Appl. Microbiol.**, v.37, n.3, p.216-228, 2014.
- LIU, G. X.; HU, P.; ZHANG, W.; WU, X.; YANG, X.; CHEN, T.; ZHANG, M.; LI, S. W. Variations in soil culturable bacteria communities and biochemical characteristics in the Dongkemadi glacier forefield along a chronosequence. **Folia Microbiol.**, v. 57, p. 485-494, 2012.
- LONG, R. A.; AZAM, F. Microscale patchiness of bacterioplankton assemblage richness in seawater. **Aquat. Microb. Ecol.** v. 26, p. 103-113, 2001.
- MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J. C.; SOULAS, G.; CATROUX, G. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 5, p. 2354-2359, 2001.
- MILLER, D. N.; BRYANT, J. E.; MADSEN, E. L.; GHIORSE, W. C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 11, p. 4715-4724, 1999.
- MIRSEPASI, H.; PERSSON, S.; STRUVE, C.; ANDERSEN, L. O. B.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K. A. Microbial diversity in fecal samples depends on DNA extraction method: easyMag DNA extraction compared to QIAamp DNA stool mini kit extraction. **BMC Res Notes**, v. 7, n. 50, 2014.

MO BIO. Popular misconceptions about DNA isolation and quantification. Carlsbad. Disponível em <http://www.mobio.com/blog/2010/01/31/popular-misconceptions-about-dna-isolation-and-quantification/> >. Acesso em: 05/01/2015.

MOESENEDER, M. M.; ARRIETA, J. M.; MUYZER, G.; WINTER, C.; HERNDL, G. J. Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 8, p. 3518-3525, 1999.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B. WORM, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **Plos. Biol.**, v. 9, n. 8, p. e1001127, 2011.

MORAES, P.C. **Resposta microbiana a perturbação naturais em sedimentos costeiros**. 2012. 142 f. Tese – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MORÉ, M.I.; HERRICK, J. B.; SILVA, M. C.; GHIORSE, W. C.; MADSEN, E. L. Quantitative Cell Lysis of Indigenous Microorganisms and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 5, p. 1572-1580, 1994.

MOYER, G. R.; DÍAZ-FERGUSON, E.; HILL, J.; SHEA, C. Assessing Environmental DNA Detection in Controlled Lentic Systems. **Plos one**. v. 9, n. 7, p. e103767, 2014.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNAr. **Appl. Environ. Microb.**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MYERS, R. M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC- clump can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucl. Acids Res.**, v. 13, p. 3131–3145, 1985.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 2764-2769, 1996.

NEEFS, J-M.; VAN de PEER, Y.; HENDRIKS, L.; DE WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic. Acids. Res. Suppl.**, v. 18, p. 2237-2317, 1990.

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S RNAr in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **J Bacteriol.**, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

OLIVEIRA, M. C. de S. (Coord). **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. p. 1-43, 2007. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32770/1/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso em: 04 Abr. 2013.

- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L.D.; SIMIONI, K.C.M.; NETO, E.V.S. Bacterial diversity characterization in petroleum samples from brasilian reservoirs. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p. 445-452, 2008.
- OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 40, p. 337-365, 1986.
- OSBORNE, C. A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S RNAr gene-specific primers. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 248, p. 183-187, 2005.
- OVREAS, L.; CURTIS, T. P. Microbial diversity and ecology. In: MAGURRAN, A.E.; MCGILL, B. **Biological Diversity** – frontiers in measurement and assessment. 1. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2011.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.
- PITERINA, A.V.; PEMBROKE, J. T. “Use of PCR-DGGE Based Molecular Methods to Analyse Microbial Community Diversity and Stability during the Thermophilic Stages of an ATAD Wastewater Sludge Treatment Process as an Aid to Performance Monitoring.” **ISRN Biotechnol.**, Aug., 2013. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/162645/>. Acesso em 10 Jun. 2013.
- PORTEUS, L. A.; ARMSTRONG, J. L. Recovery of Bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. **Curr. Microbiol.**, v. 22, p. 345-348, 1991.
- PUCHOOA, D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). **Afr. J. Biotechnol.**, v. 3, n. 4, p. 253-255, 2004.
- QIAN, P-Y.; WANG, Y.; LEE, O. O.; LAU, S. C. K.; YANG, J.; LAFI, F. F.; AL-SUWAILEM, A.; WONG, T. Y. H. Vertical stratification of microbial communities in the Red Sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing. **ISME J.**, v. 5, p. 507-518, 2011.
- QUERELLOU, J.(Coord). Marine Biotechnology: A New Vision and Strategy for Europe. **Marine Board-ESF.**, p. 1 – 96, 2010.
- RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; JANSSEN, P. H.; HIPPE, H.; STACKEBRANDT, E. *Clostridium paradoxum* DSM 7308(T) contains multiple 16S RNAr genes with heterogeneous intervening sequences. **Microbiology**, v. 142, p. 2087-2095, 1996.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, R. Strategies for accessing soil etagenome for desired applications. **Biotechnol. Adv.**, v. 26, p. 576-590, 2008.
- RITTMANN, B. E.; HAUSNER, M.; LÖFFLER, F.; LOVE, N. G.; WAGNER, M. A. A vista for Microbial Ecology and Environmental. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40. p. 1096-1103, 2006.
- RIVERA, I. N. G.; LIPP, E.; GIL, A.I.; CHOOPUN, N.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environ. Microbiol.**, v. 5, n. 7, p. 599 - 606, 2003.

- RIVERA, I. N. G.; PAULA, C. R.; SOUZA, C. P. Microbiologia aquática marinha. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, p. 609-627.
- RODRIGUES, C. S.; SOUZA, S. S.; REZENDE, R. P.; SILVA, A.; ANDRIOLI, J. L.; COSTA, H.; FONTANA, R.; DIAS, J. C. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for detection of bacterial and yeast communities along a salinity gradient in the estuary of the Cachoeira River in Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 12, n. 2, p. 1752 – 1760, 2013.
- ROGERS, N. L.; COLE, S. A.; LAN, H-C.; CROSSA, A.; DEMERATH, E. W. New Saliva DNA Collection Method Compared to Buccal Cell Collection Techniques for Epidemiological Studies. **Am. J. Hum. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 319-326, 2007.
- ROH, C.; VILLATE, F.; KIM, B-G.; SCHMID, R. D. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 134, p. 97–112, 2006.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotechnolog. Cienc. Desenvolv.**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.
- ROUX, S.; TOURNAYRE, J.; MAHUL, A.; DEBROAS, D.; ENAULT, F. Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 76, 2014.
- SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of Burkholderia species in soil: Effect of crop and land use history. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 vol.
- SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; LEITE, D. C. A.; JESUS, H. E.; DE CARVALHO MAALOUF, P.; ALMEIDA, C.; SORIANO, A. U.; ALTOMARI, D.; SUHETT, L.; VÓLARO, V.; VALONI, E.; FRANCISCO, M.; VIEIRA, J.; ROCHA, R.; SARDINHA, B. L.; MENDES, L. B.; JOÃO, R. R.; LACAVA, B.; JESUS, R. F.; SEBASTIAN, G. V.; PESSOA, A.; VAN ELSAS, J. D.; REZENDE, R. P.; PIRES, D. O.; DUARTE, G.; CASTRO, C. B.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Comparison of differen protocols for the extraction of microbial DNA from reef corals. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n. 2 p. 517-527, 2012.
- SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process. Biochem.**, v. 42, p. 119-133, 2007.
- SCHLEIFER, K. H.; KANDLER, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Bacteriol. Rev.**, v. 36, n. 4, p. 407-77, 1972.
- SCHLOSS, P. D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S. L. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S RNAr-Based Studies. **Plos one**, v. 6, n. 12, p. e27310, 2011.
- SCUPHAM, A. J.; JONES, J. A.; WESLEY, I. V. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, n. 2, p. 401-409, 2007.



SILVEIRA, C. B.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; PARANHOS, R.; ALBANO, R. M.; MARTINS, O. B. Influence of Salinity on Bacterioplankton Communities from the Brazilian Rain Forest to the Coastal Atlantic Ocean. **Plos one**, v. 6, n. 3, p. e17789 2011.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, n. 32, p. 12115–12120, 2006.

SOMERVILLE, C. C.; KNIGHT, I. T.; STRAUBE, W. L.; COLWELL, R.R. Simple, Rapid Method for Direct Isolation of Nucleic Acids from Aquatic Environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 3, p. 548-554, 1989.

STACH, J. E. M.; BATHE, S.; CLAPP, J. P.; BURNS, R.G. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 36, p. 139-151, 2001.

STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. **Proc. Biol. Soc. Wash.**, v. 6, p. 389-400, 1984.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 39, p. 321-346, 1985.

STEFFAN, R. J.; GOKSOYR, J.; BEK, A. K.; ATLAS, R. M. Recovery of DNA from Soils and Sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, n. 12, p. 2908-2915, 1988.

SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, p. 356–361, 2005.

SWIFT, M. J.; ANDRÉN, O.; BRUSSAARD, L.; BRIONES, M.; COUTEAUX, M-M.; EKSCMITT, K.; KJOLLER, A.; LOISEAU, P.; SMITH, P. Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. **Glob. Change Biol.**, v. 4, n. 7, p. 729-743, 1998.

TANG, X.; GAO, G.; ZHU, L.; CHAO, J.; QIN, B. DNA extraction procedure affects organic-aggregate-attached bacterial community profiles from a shallow eutrophic lake. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 776-782, 2009.

TAPPEH, K. H.; HANIFIAN, H.; DIBA, K. Comparison of Four Methods for DNA Extraction From *Echinococcus granulosus* Protoscoleces. **Turkiye Parazitol. Derg.**, v. 36, p. 100-104, 2012.

TEBBE, C. C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 59, p. 2657–2665, 1993.

THERMO-SCIENTIFIC. **260/280 and 260/230 Ratios**. T042-Technical Bulletin. Wilmington, Delaware - USA, 2009. Disponível em:

<<http://www.phenogenomics.ca/transgenics/docs/NanoDrop%20Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>> Acesso em: 21 May, 2013

THOMPSON, C. L. Analysis of community dynamics in environmental samples using denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods Mol. Biol.**, v. 1096, p. 45-55, 2014.

TORSVIK, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil. Biol. Biochem.**, v. 12, p. 15-21, 1979.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TRIFUNAC, N. P.; KRASNA, A. I. Alterations in structure and function of transfer ribonucleic acid on chemical methylation. **Biochem.**, v. 13, n. 11, p. 2403-2409, 1974.

TSAI, Y-L.; OLSON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 2292-2295, 1992.

URAKAWA, H.; MARTENS-HABBENA, W.; STAHL, D. A. High Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea in Coastal Waters, Determined Using a Modified DNA Extraction Method. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 7, p. 2129-2135, 2010.

VALLAEYS T.; TOPP E.; MUYZER G.; MACHERET V.; LAGUERRE G.; SOULAS G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 24, p. 279-285, 1997

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 309, n. 1, p. 1-7, 2010.

WAHLBERG, K.; HUGGETT, J.; SANDERS, R.; WHALE, A. S.; BUSHELL, C.; ELASWARAPU, R.; SCOTT, D. J.; FOY, C. A. Quality Assessment of Biobanked Nucleic Acid Extracts for Downstream Molecular Analysis. **Biopreserv. Biobank.**, v. 10, n. 3, p. 266-275, 2012.

WALKER, D. Diversity and stability. In: CHERRETT, J.M., **Ecological concepts**. Oxford, Blackwell Scientific Public, p. 115 – 146, 1989.

WANG, L. Y.; QIAN, P-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S RNAr Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **Plos one**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

WANG, Q. T.; XIAO, W.; MINDRINOS, M.; DAVIS, R. W. Yeast tRNA as carrier in the isolation of microscale RNA for global amplification and expression profiling. **Biotechniques**, v. 33, p. 788-796, 2002.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WIEDENBECK, J.; COHAN, F. M. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. **Microbiol. Rev.**, v. 35, p. 957-976, 2011.

WILLNER, D.; DALY, J.; WHILEY, D.; GRIMWOOD, K.; WAINWRIGHT, C. E.; HUGENHOLTZ, P. Comparison of DNA Extraction Methods for Microbial Community Profiling with an Application to Pediatric Bronchoalveolar Lavage Samples. **Plos one**, v. 7, n. 4, p. e34605, 2012.

WINKLER, M-K. H.; KLEEREBEZEM, R.; BRUIM, L. M. M.; VERHEIJEN, P. J. T.; ABBAS, B.; HABERMACHER, J.; LOOSDRECHT, M. C. M. Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, n. 16, p. 7447-7458, 2013.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WU, J.; LIN, I-H.; HAYES, R. B.; AHN, J. Comparison of DNA Extraction Methods for Human Oral Microbiome Research. **Br. J. Med. Med. Res.**, v. 4, n. 10, p. 1980-1991, 2014.

ZHANG, W. Analysis of the archaea communities in fields with long-term continuous cotton cropping. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 13, n. 3, p. 456-464, 2014.

ZHAO, F.; XU, K. Efficiency of DNA extraction methods on the evaluation of soil microeukaryotic diversity. **Acta Ecologica Sinica**. v. 32, n. 4, p. 209-214, 2012.

ZHAO, L.; MA, T.; GAO, M.; GAO, P.; CAO, M.; ZHU, X.; LI, G. Characterization of microbial diversity and community in water flooding oil reservoirs in China. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 3039-3052, 2012.

ZHOU, J.; BRUNS, M.; TIEDJE, J. M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 316-322, 1996.

ZHOU, J.; HE, Z.; YANG, Y.; DENG, Y.; TRINGE, S. G.; ALVAREZ-COHEN, L. High-Throughput Metagenomic Technologies for Complex Microbial Community Analysis: Open and Closed Formats. **mBio.**, v. 6, n. 1, p. e02288-14, 2015.

ZHOU, M-Y.; WANG, G-L.; LI, D.; ZHAO, D-L.; QIN, Q-L.; CHEN, X-L.; CHEN, B.; ZHOU, B-C.; ZHANG, X-Y.; ZHANG, Y-Z. Diversity of Both the Cultivable Protease-Producing Bacteria and Bacterial Extracellular Proteases in the Coastal Sediments of King George Island, Antarctica. **Plos one**, v. 8, n.11, p. e79668, 2013.