



AVANÇOS E APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA qPCR PARA O ESTUDO DE MICRORGANISMOS DO SOLO

ADVANCEMENTS AND APPLICATIONS OF qPCR TECHNOLOGY FOR SOIL MICROORGANISMS' STUDIES

Marco Aurélio BATISTA*¹ • Gabriela Gomes LIMA*¹ • Lucas Matheus Rodrigues PEREIRA*¹ • Matheus Santos LIMA*¹ • Náthala Maria SIMÃO*¹ • Maloni Montovanni Mafei CÉSAR*¹ • Brenda Oliveira GUIMARÃES*¹ • Monatha Nayara Guimarães TEÓFILO*¹ • Adriano Roberto Vieira de SOUSA*¹ • Luciane Madureira ALMEIDA*¹ • Samantha Salomão CARAMORI*¹

Resumo

A saúde do solo está intrinsecamente ligada à abundância e diversidade e de microrganismos nele presente. Diferentes ferramentas moleculares têm sido empregadas na investigação da abundância e diversidade de microrganismos no solo, dentre elas a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Como as publicações científicas sobre qPCR envolvem uma imensa variedade de aplicações, optou-se neste artigo realizar uma mini revisão da literatura sobre o uso da técnica de qPCR para o estudo de microrganismos de solo. Em relação a estes organismos, a qPCR permite uma avaliação rápida da abundância de grupos filogenéticos específicos, além de sugerir alterações na diversidade de espécies. Apesar de não avaliar diretamente a diversidade ambiental, esta técnica é capaz de detectar alterações ocorridas em grupos específicos sob diferentes condições ambientais. Nossos resultados demonstram um aumento contínuo de métricas quantitativas e qualitativas na literatura associados à utilização de ensaio da qPCR em comunidades do solo. As principais vantagens citadas incluem alta especificidade, sensibilidade, precisão e rapidez. Em relação as limitações, são mencionadas a necessidade de obter DNA de alta qualidade, uso de controles adequados para reação de qPCR, conhecimento prévio da sequência estudada e a possibilidade da presença de inibidores da reação. De forma geral, qPCR tem ampliado o conhecimento sobre o papel dos microrganismos no solo, e tem auxiliado no desenvolvimento de melhores estratégias de conservação e manejo que promovam a sustentabilidade desse ecossistema.

Palavras-chave: Ferramenta molecular; Biodiversidade do solo; PCR em tempo real.

Abstract

Soil health is intrinsically associated with the microorganism's abundance and diversity. Different molecular tools have been used to investigate the abundance and diversity of microorganisms in soil, including the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique. As scientific publications on qPCR involve an immense variety of applications, and the number of publications has increased over the years, in this article it was decided to carry out a mini literature review on the use of the qPCR technique for the study of soil microorganisms. Regarding to these organisms, qPCR allows a rapid assessment of the abundance of specific phylogenetic groups, in addition to suggesting changes in species diversity. This is because, despite not directly assessing environmental diversity, this technique can detect changes occurring in specific groups under different environmental conditions. Our results demonstrate a continuous increase in quantitative and qualitative metrics in the literature associated with the use of qPCR assays in soil communities. The main advantages cited include high specificity, sensitivity, precision, and speed. Regarding limitations, the need to obtain high-quality DNA, use of appropriate controls for the reaction, prior knowledge of the sequence studied and the possibility of the presence of reaction inhibitors are mentioned. qPCR has expanded knowledge about the role of microorganisms in the soil and has helped in the development of better conservation and management strategies that promote the sustainability of this ecosystem.

Keywords: Molecular tool; Soil biodiversity; Real-time PCR.

✉ Marco Aurélio Batista, m_batista@outlook.com.br

¹Universidade Estadual de Goiás (UEG), RENAC, Anápolis, Goiás, Brasil.

Batista MA, <https://orcid.org/0000-0002-3478-9252>

Lima GG, <https://orcid.org/0000-0001-8811-4886>

Pereira LMR, <https://orcid.org/0009-0009-4086-0527>

Lima MS, <https://orcid.org/0009-0007-5164-5457>

Simão NM, <https://orcid.org/0009-0007-6800-3813>

Guimarães BO, <https://orcid.org/0000-0002-2986-3040>

César MMM, <https://orcid.org/0009-0009-9081-2697>

Teófilo MNG, <https://orcid.org/0000-0001-5043-4526>

Silva ARV, <https://orcid.org/0000-0002-2858-4680>

Almeida LM, <https://orcid.org/0000-0003-1764-1480>

Caramori SS, <https://orcid.org/0000-0003-2676-8280>

Introdução

A aplicação de técnicas moleculares tem permitido avanços em estudos das comunidades de microrganismos do solo. Essas comunidades de microrganismos consistem em centenas a milhares de bactérias, fungos, arqueas e vírus que influenciam nas características físicas, químicas e biológicas do solo (CUSTÓDIO et al., 2022). Esses grupos desempenham papéis essenciais na

decomposição de matéria orgânica, fixação de nitrogênio, mineralização de nutrientes e transformação de metais pesados em formas menos tóxicas (HARGREAVES; ROBERTO; HOFMCKEL, 2013). Em termos gerais, a fertilidade e a saúde do solo estão essencialmente ligadas à presença (abundância) e diversidade de microrganismos que nele habitam (NKONGOLO; NARENDRULA-KOTHA, 2020).

Estimativas sugerem que apenas 1-10% dos microrganismos do solo têm sido identificados (MATTOS, 2015). Os métodos clássicos de identificação se baseiam na avaliação do meio de obtenção de energia e carbono, nas exigências nutricionais e meio de cultivo de crescimento, na observação da estrutura por microscópio (KENNEDY, 1999). Estes métodos são laboriosos e levam muito tempo na execução, além disto os microrganismos são colocados em condições adversas as quais eles se encontravam quando associados aos seus habitats (SANTOS et al., 2002). A utilização destas metodologias fornece informações limitadas e com necessidade de complementação. Para superar estas dificuldades, cada vez mais tem se utilizado técnicas moleculares.

Assim, nas últimas décadas as tecnologias baseadas na amplificação dos ácidos nucleicos (PCR) foram otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas por estes métodos tradicionais de estudo de populações microbianas. É importante lembrar que na PCR convencional, os resultados só podem ser analisados no final da reação. Além disto, o resultado é apenas qualitativo (ausência ou presença do fragmento amplificado), mas não quantitativo. Desta forma, o surgimento da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR ou PCR em tempo real) permitiu ter resultados quantitativos e em tempo real, utilizando-se um laser acoplado ao termociclador e marcando os ácidos nucleicos com um corante que gerasse fluorescência (HIGUCHI et al., 1993). A qPCR é uma variação da técnica de PCR convencional, e segue as mesmas etapas. Ou seja, consiste em repetidos ciclos de amplificação do DNA, onde primeiramente o DNA é desnaturado, seguido pelo anelamento dos oligonucleotídeos e, subsequentemente extensão da cadeia pela ação da enzima polimerase. O diferencial é que na qPCR, a cada ciclo ocorre a quantificação do DNA amplificado (ciclo de quantificação Cq) pela detecção de fluorescência (SMITH; OSBORN, 2009). Duas tecnologias são as mais utilizadas

para quantificar a fluorescência, o uso do corante intercalante SYBR Green ou o sistema TaqMan.

SYBR Green é um método relativamente econômico e fácil de utilização. Baseia-se no fato de que o corante se liga ao ácido desoxirribonucléico de fita dupla (dsDNA) e emite fluorescência 1.000 vezes maior do que está livre em solução (HUANG et al., 1995). Por esta razão, a quantidade crescente de dsDNA presente no tubo de reação leva à maior quantidade de corantes ligados e ao aumento do sinal fluorescente do SYBR Green. A preocupação com o uso deste método é a especificidade, uma vez que produtos não específicos podem emitir fluorescência. Assim, uma vez finalizados os ciclos de amplificação, uma curva de dissociação ou curva de melting é gerada para confirmar se o sinal de fluorescência emitida pertence apenas à amplificação da região de interesse e não a produtos inespecíficos (SMITH; OSBORN, 2009).

O sistema TaqMan é um método mais caro, porém altamente específico. Nele as sondas de hidrólise são oligonucleotídeos de DNA duplamente marcados com fluoróforo, um chamado de supressor e o outro é o repórter. O supressor e o repórter estão próximos no mesmo oligonucleotídeo. O supressor absorve o sinal do repórter durante a amplificação, a atividade da DNA polimerase 5'-nuclease separa o oligonucleotídeo e o repórter e o supressor se separam, permitindo que o sinal fluorescente do repórter seja liberado (TAJADINI et al., 2014).

A qPCR tem ampliado o conhecimento sobre o papel dos microrganismos no solo, tanto no que diz respeito à saúde do solo quanto ao desempenho dos serviços ecossistêmicos. Assim, a qPCR tem auxiliado no desenvolvimento de melhores estratégias de conservação e manejo que promovem a sustentabilidade desse ecossistema (SMITH; OSBORN, 2009). Como as publicações científicas sobre qPCR envolvem uma imensa variedade de aplicações, e o número de publicações tem aumentado ao longo dos anos, optou-se neste artigo realizar uma mini-revisão da literatura sobre o uso da técnica de qPCR para o estudo de microrganismos de solo. Este artigo tem como objetivo mostrar as principais aplicações e limitações da tecnologia da qPCR na avaliação das comunidades microbianas presentes no solo e a aceitação desta técnica no meio científico através de uma análise bibliométrica.

análise final da reação (MACKAY et al., 2007). Estas novas plataformas são de fácil acessibilidade, alta reprodutibilidade e robustez, o que tem levado ao sucesso desta nova tecnologia (SMITH E OSBORN, 2009).

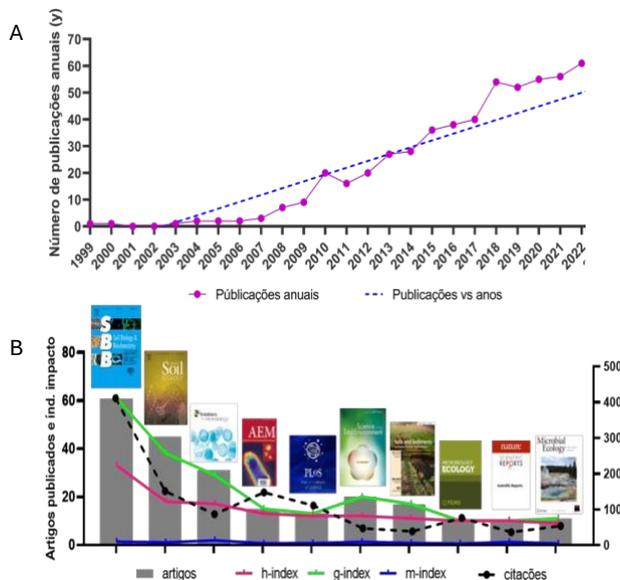


Figura 3. Dados bibliométricos sobre o uso da qPCR para estudo das comunidades de microrganismos do solo. A. Tendência de crescimento no número de publicações anuais. B. Revistas científicas que abordam o tema do emprego da qPCR em estudo de solos, e número de artigos publicados, índices de impacto (h, g e m- index) e número de citações.

A Figura 3B apresenta a evolução de publicações anuais relacionadas à temática da qPCR como ferramenta molecular. Pode-se observar um aumento no número absoluto de publicações, principalmente quando se analisa esse recorte temporal de mais de duas décadas. A partir desses dados pode-se inferir que tal fator esteja relacionado ao incentivo à pesquisa com aumento do financiamento de projetos, crescimento e ampliação de instituições de ensino-pesquisa e o aumento de plataformas de publicação de trabalhos acadêmico-científicos totalmente digital, o que contribui para o aumento do número de produções.

Os periódicos que mais publicaram sobre o tema estão representados na Figura 3B, e são Soil Biology & Biochemistry (com 26% dos artigos e 9.7 FI), Applied Soil Ecology (19% artigos e 4.8 FI), Frontiers in Microbiology (13% artigos e 5.2 FI), Science of the Total Environment (8% artigos e 9.8 FI), Journal of Soils and Sediments (7% artigos e 3.6 FI), Applied and Environmental Microbiology (6% artigos e 5.0 FI), Plant and Soil

(6% artigos e 4.9 FI), Plos One (5% artigo e 3.7 FI), Microbial Ecology (5% artigos e 3.6 FI), Fems Microbiology Ecology (4% artigos e 4.2 FI). Os periódicos que lideram em publicações também se destacam em fatores de impacto e índices mais elevados. Isso indica que os artigos mantêm um padrão de qualidade, sendo veiculados em periódicos de excelência. Adicionalmente, eles são acessados por pesquisadores de diversas partes do mundo, contribuindo para a disseminação do conhecimento na área e a interligação de ideias.

Emprego da técnica de qPCR para avaliação, abundância e diversidade de microrganismos no solo

As medidas de abundância e diversidade são importantes para caracterizar as comunidades microbianas do solo e com isso fazer inferências sobre a sua saúde. De uma forma geral, a qPCR pode ser utilizada para avaliação rápida da abundância, porém ela não é capaz de avaliar a diversidade global de uma amostra. Isto devido ao fato de a reação de amplificação depender do uso de iniciadores específicos que determinam a sequência alvo do DNA. Assim, pode-se dizer que especificidade da qPCR é determinada pelo desenho dos primers e sondas, e permitem a quantificação de marcadores genéticos taxonômicos presentes em uma comunidade mistas, como as do solo. A qPCR tem sido empregada para avaliar a estrutura da comunidade microbiana do solo em níveis taxonômicos gerais e quantificar a abundância dos grupos predominantes de bactérias e fungos encontrados no solo (FIERER et al., 2005). A abundância de microrganismos no solo pode ser afetada por diferentes fatores, tais como pH, umidade, presença de materiais orgânicos ou pela presença de agentes químicos.

Embora a qPCR não avalie diretamente a diversidade ambiental, a técnica é capaz de detectar alterações ocorridas em grupos específicos sob diferentes condições ambientais. Assim, pode ser comparada a diversidade de microrganismos antes e depois da exposição a diferentes substâncias químicas (pesticidas, fertilizantes, nanopartículas, microplásticos) condições ambientais (pH, temperatura, porosidade ou tipo de solo), infecção por patógenos e outros. A Tabela 1 mostra exemplos de artigos que utilizaram a qPCR para avaliar abundância ou diversidade do solo.

Tabela 1. Resumo dos artigos relevantes (10 mais citados) sobre a aplicação da técnica de qPCR para avaliação de microrganismos do solo.

Referência	Microrganismo	Tipo de análise	Condição testada
ROUSK. <i>et al.</i> , 2010	Bactéria e fungo	Abundância	Avaliação através de um gradiente de pH (4,0 - 8,3).
LAUBER <i>et al.</i> , 2008	Bactéria e fungo	Diversidade e abundância	Diferentes usos do solo (campos cultivados, pastagens, plantações de pinheiros e florestas mistas).
FIERER <i>et al.</i> , 2005	Bactéria e fungo	Abundância	Três solos distintos (pradaria de grama alta, deserto com vegetação arbustiva e floresta de coníferas).
URICH <i>et al.</i> , 2008	Bactéria e fungo	Diversidade e abundância	Solo de uma área de proteção ambiental.
HARTER <i>et al.</i> , 2014	Bactéria	Abundância	Solo tratado com biochar (carvão usado pela pirólise da biomassa) para decompor o N ₂ O.
de GRAAFF <i>et al.</i> , 2010	Bactéria e fungo	Abundância	Diferentes concentrações de C lábil que são comumente encontrados em exsudatos de raízes.
CHEN <i>et al.</i> , 2013	Bactéria e fungo	Diversidade e abundância	Solo de arrozal após aplicação de biochar (0,20 e 40 t ha ⁻¹).
SILES; MARGESIN., 2016	Bactéria e fungo	Diversidade e abundância	Gradiente de altitude em florestas alpinas.
DEANGELIS <i>et al.</i> , 2009	Bactéria	Diversidade e abundância	Avaliação através de zonas de rizosfera de raízes de aveia selvagem.
YERGEAU <i>et al.</i> , 2010	Bactéria	Diversidade e abundância	Amostra de solo de permafrost de 2m de profundidade e sua camada superficial.

As principais vantagens da qPCR são a alta especificidade, a sensibilidade e a precisão (MUYZER; STAMS, 2008). Além disto, é uma técnica relativamente simples e com a obtenção de resultados rápidos, uma vez que não é necessário a realização de eletroforese em gel para visualização dos resultados (LIMA et al., 2022). Assim, fornece dados mais refinados, permitindo o acesso a genes específicos que fornecem informações sobre a organização e o quantitativo de grupos microbianos específicos no ambiente (HUANG et al., 2009). Para o estudo de diversidade e abundância a uma das sequências mais utilizada é a do 16S rRNA (VETROVSY; BALDRIAN, 2013). Este é um gene presente em todos os procariontos e que possui regiões hipervariáveis intercaladas com regiões filogeneticamente conservadas (PATWARDHAN et al., 2014).

Limitações da qPCR na caracterização de comunidades do solo

Apesar de seu sucesso e potencial tecnológico, o qPCR têm questões que devem ser adequadamente abordadas para que os resultados obtidos sejam confiáveis. Uma das questões é a extração e purificação de DNA genômico de bom rendimento e qualidade (McKEE et al., 2015). O primeiro passo na análise molecular dos solos – a extração do ácido nucleico – é muito crítico para a

posterior interpretação quantitativa dos dados, portanto é necessário garantir que todos os tipos celulares sejam lisados com igual eficiência para uma análise qualitativa. Embora muito esforço tenha sido feito na otimização de protocolos, ainda não existe um padrão de consenso definido para garantir o controle de qualidade para extrações de ácidos nucleicos de diferentes tipos de solo e comunidades microbianas.

Outra questão é a escolha de controles adequados no processo de amplificação (RUIZ-VILLALBA et al., 2017). Pesquisa que não incluem controles qPCR adequados o que afeta significativamente a conclusão experimental (LIMA et al., 2022). Para minimizar estes problemas foram criadas as Diretrizes MIQE (Informações Mínimas para Publicação de Experimentos Quantitativos de PCR em Tempo Real) as quais são fundamentais para melhorar a reprodutibilidade, análise de dados, interpretação e transparência geral dos relatórios experimentais qPCR (BUSTIN et al., 2009). Contudo, ainda há um número significativo de artigos de que não consideram a extração do DNA e uso de controles na quantificação de amostras biológicas, o que, sem dúvida, leva a conclusões experimentais tendenciosas (LIMA et al., 2022).

Além da confiabilidade dos resultados, existem problemas associados a eficiência da

reação da qPCR. A eficiência desta técnica depende de vários fatores, tais como a seleção dos oligonucleotídeos iniciadores, a origem e qualidade da amostra a ser quantificada, a concentração dos reagentes utilizados, e a presença de inibidores (NOLAN et al., 2006).

O solo também pode conter substâncias que atuam como inibidores na reação de qPCR. A presença de ácidos húmicos ou substâncias húmicas que são co-extraídas com ácidos nucleicos do solo pode inibir enzimas como a Taq DNA polimerase (TEBBE; VAHJEN, 1993). Outro inibidor é a presença de alto teor de argila, substâncias orgânicas que alteram o pH do solo e da quantidade de carbono (MACRAE, 2000; BAKKEN; FROSTEGARD, 2006). A presença de inibidores também pode levar a diminuição da sensibilidade ou mesmo a resultados de PCR falso-negativos (SCHRADER et al., 2012). Assim, é necessária a adoção de protocolos padronizados para extração desenvolvidos para evitar esse tipo de inibição, mas considerando matrizes complexas como o solo, os desafios são imensos e podem ainda não apontarem dados satisfatórios ao pesquisador. Um estudo comparativo de protocolos de extração demonstrou que a escolha do protocolo interfere na qualidade, quantidade e a composição dos ácidos nucleicos (WUST et al. 2016). Além da qualidade do DNA e presença de inibidores, o qPCR ainda apresenta a mesma limitação que as outras técnicas de amplificação, que consiste no conhecimento prévio do genoma ou sequência de interesse.

Distribuição mundial dos trabalhos com qPCR para caracterização de comunidades do solo

Quanto à distribuição mundial das publicações, 20 países têm utilizado o qPCR na quantificação e qualificação de microrganismos de solo (Figura 4). A China, Estados Unidos e Austrália são os países que mais publicaram no tema. Por outro lado, houve baixa incidência de publicações em países da África, da Eurásia e da América do Sul. Uma possível explicação para a falta de artigos sobre esse tema nesses países pode

ser a utilização de outros indicadores para avaliar a abundância e diversidade comunidades presentes no solo, tais como as técnicas de DNA fingerprinting ou sequenciamento de alto rendimento.

As técnicas moleculares clássicas utilizadas para avaliação de diversidade de microrganismos de solo, se baseadas no DNA fingerprinting, envolvem a amplificação do DNA extraído do solo e posterior eletroforese para separação dos fragmentos amplificados (MUYZER, 1999). Tradicionalmente são utilizadas técnicas, tais como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); ARDA (Análise de restrição DNA ribossomal amplificado) DDGE (Eletroforese em gel com gradiente desnaturante) entre outros. Apesar destas técnicas fingerprinting tradicionais serem simples e de baixo custo, elas são trabalhosas e despendem maior tempo de execução e de análise dos dados. Todos os métodos de fingerprinting utilizam a variação do comprimento dos fragmentos de DNA dentro de diferentes espécies microbianas, mas os resultados não especificam os táxons individuais responsáveis por um determinado perfil (YOUNG et al., 2014). Em contraste, o sequenciamento de alto rendimento pode produzir milhares de leituras de sequenciamento por amostra, fornecendo uma imagem muito mais detalhada das comunidades microbianas presentes no solo. Contudo sua aplicação possui muitas limitações, como o fato desta técnica gerar muitos dados e nem sempre é possível identificar as espécies presentes nas amostras com precisão. Ou o fato de detectar microrganismos mortos (DNA inativo), o que pode levar a uma superestimação de diversidade microbiana em determinado ambiente. A técnica requerer equipamentos de ponta e reagentes específicos, tornando o custo elevado. Atualmente, a disponibilidade de diferentes plataformas de sequenciamento com a diminuição dos custos e tornou a técnica mais acessível para diferentes centros de pesquisa e tem gerado imenso volume de informação (SHENDURE; JI, 2008).

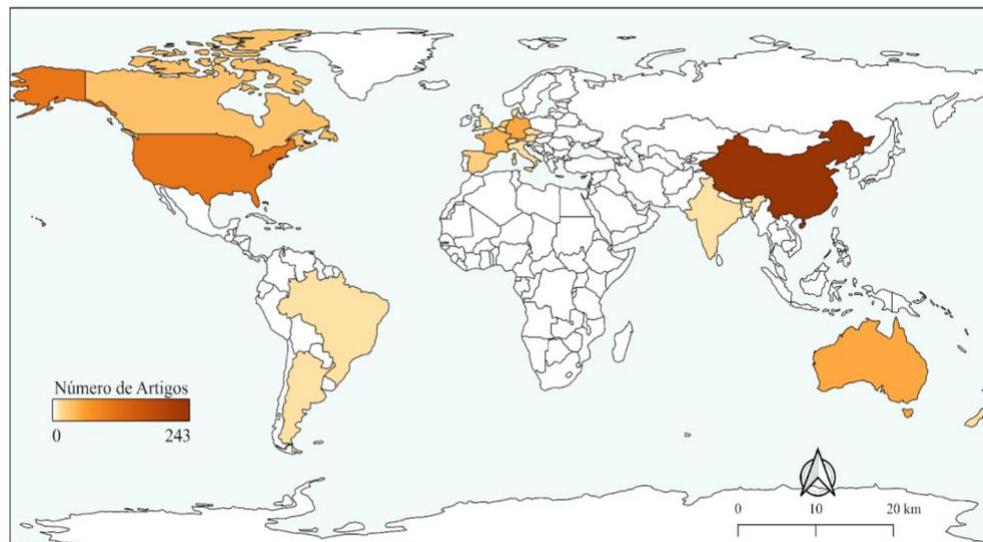


Figura 3. Produção mundial dos artigos científicos publicados durante o período de 1991 a 2023 em relação ao uso da técnica de qPCR na análise das comunidades do solo.

Conclusão

A qPCR oferece vantagens significativas, como alta sensibilidade e capacidade de quantificar genes específicos em amostras ambientais. Isto de certa forma permitiu uma compreensão mais profunda das comunidades microbianas do solo e seu papel central na saúde dos ecossistemas. No entanto, também existem desafios a superar, como a extração de DNA de amostras complexas de solo e o desenvolvimento de estratégias para superar a possibilidade de

inibidores nas reações da qPCR. A adaptação dos protocolos de extração e a otimização de técnicas são desafios contínuos para mitigar essas limitações. A análise bibliométrica mostrou um aumento constante de publicações na área, o que reflete o interesse da comunidade científica na interação do solo e os microrganismos que vivem nele. Os dados sugerem que a investigação nessa área continuará a progredir, conduzindo a uma compreensão mais profunda da ecologia microbiana do solo e seu impacto na saúde dos ecossistemas.

Referências

BAKKEN, Lars R.; FROSTEGÅRD, Åsa. Nucleic acid extraction from soil. In: *Nucleic acids and proteins in soil*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 49-73.

BUSTIN, S. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, v. 55, p.611–622, 2009. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.112797>.

CHEN, J. et al. Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from Southwest China. *Applied Soil Ecology*, v. 71, p. 33-44, 2013.

CUSTÓDIO, V. et al. Sculpting the soil microbiota. *The Plant Journal*, v. 109, n. 3, p. 508-522, 2022.

DEANGELIS, K. M. et al. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *The ISME Journal*, v. 3, n. 2, p. 168-178, 2009.

DE GRAAFF, M. A. et al. Labile soil carbon inputs mediate the soil microbial community composition and plant residue decomposition rates. *New Phytologist*, v. 188, n. 4, p. 1055-1064, 2010.

FIERER, N. et al. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 7, p. 4117-4120, 2005.

GARCIA, D.C.F.; GATTAZ, C.C.; GATTAZ, N.C. A Relevância do Título, do Resumo e de Palavras-chave para a Escrita de Artigos Científicos. *Revista de Administração Contemporânea*, Maringá, v. 23, n. 3, p.1-9, 2019.

HARGREAVES, S.K.; ROBERTO, A.A.; HOFMOCKEL, K.S. Reaction-and sample-specific inhibition affect standardization of qPCR assays of soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 59, p. 89-97, 2013.

HARTER, J. et al. Linking N₂O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. *The ISME Journal*, v. 8, n. 3, p. 660–674, 2014.

- HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplifications reactions. *Biotechnology*, v. 11, p. 1026–1030, 1993.
- HUANG, W.E. et al. Resolving genetic functions within microbial populations: in situ analyses using rRNA and mRNA stable isotope probing coupled with single-cell Raman-fluorescence in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, n. 1, p. 234-241, 2009.
- HUANG, S.K., YI, M., PALMER, E., MARSH, D.G. A dominant T cell receptor beta-chainin response to a short ragweed allergen, *Amb a 5*. *Journal Immunology* v.154, p.6157–6162, 1995.
- LAUBER, C. L. et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 2407-2415, 2008.
- LIMA, et al. DNA extraction leads to bias in bacterial quantification by qPCR *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 106, p 7993-8006, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12276-4>
- MACKAY, I. M., et al. Real-time PCR; History and Fluorogenic Chemistries. In: *Real-Time PCR in Microbiology From diagnosis to characterization*. Horizon Press - Calister Academic Press, 40 p. 2007. ISBN 978-1-904455-18-9.
- MACRAE, Andrew. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of microbiology*, v. 31, p. 77-82, 2000.
- MATTOS, M. L. T. *Microbiologia do solo*. In: NUNES, R. R.; REZENDE, M. O. O. (Org.). *Recurso Solo: Propriedades e Usos*. São Carlos: Editora Cubo, 2015. p. 250-272. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1034181>.
- MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews in Microbiology*, v. 6, n. 6, p. 441-454, 2008.
- NKONGOLO, K.K.; NARENDRULA-KOTHA, R. Advances in monitoring soil microbial community dynamic and function. *Journal of Applied Genetics*, v. 61, n. 2, p. 249-263, 2020.
- NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RTPCR. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006.
- PATWARDHAN, Anand; RAY, Samit; ROY, Amit. Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, v. 2, n. 2, p. 131, 2014.
- ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.
- RUIZ-VILLALBA, A., et al. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomol Detect Quantif*, v. 14, p. 7–18, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.001>
- SANTOS, S. T. dos; DIREITO, I. C. N; TEIXEIRA, K. R. S. dos. Isolamento e amplificação de DNA de amostras de solo como ferramenta para avaliar a diversidade das populações de bactérias em solos agrícolas. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 2002. Embrapa Agrobiologia. Documentos, 148.
- SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors– occurrence, properties and removal. *Journal Appl Microbiol*, v. 113, n. 5, p. 1014–1026, 2012.
- SILES, J. A.; MARGESIN, R. Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: what are the driving factors? *Microbial Ecology*, v. 72, p. 207-220, 2016.
- SMITH, C.J.; OSBORN, A. Mark. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 67, n. 1, p. 6-20, 2009.
- TAJADINI M, PANJEHPOUR M, JAVANMARD SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. v. 28, n. 3, p.85, 2014. doi: 10.4103/2277-9175.127998
- TEBBE, Christoph C.; VAHJEN, Wilfried. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and environmental microbiology*, v. 59, n. 8, p. 2657-2665, 1993.
- URICH, T. et al. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PLoS One*, v. 3, n. 6, p. e2527, 2008.
- VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, p.e57923, 27 fev. 2013.
- YERGEAU, E. et al. The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses. *The ISME Journal*, v. 4, n. 9, p. 1206-1214, 2010.
- WUST, P.K. et al. Estimates of soil bacterial ribosome content and diversity are significantly affected by the nucleic acid extraction method employed. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, n. 9, p. 2595–2607, 2016