

Metagenômica e sua Aplicação no Estudo de Diversidade e Função de Microrganismos de Solos do Cerrado



ISSN 1517-5111
ISSN online 2176-5081
Março, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 284

Metagenômica e sua Aplicação no Estudo de Diversidade e Função de Microrganismos de Solos do Cerrado

Marco Aurélio Caldas de Pinho Pessoa Filho

Embrapa Cerrados
Planaltina, DF
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Fernando Antônio Macena da Silva*

Secretária-Executiva: *Marina de Fátima Vilela*

Secretária: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Equipe de revisão: *Francisca Elijani do Nascimento*

Jussara Flores de Oliveira Arbués

Assistente de revisão: *Elizelva de Carvalho Menezes*

Normalização bibliográfica: *Paloma Guimarães Correa de Oliveira*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Foto(s) da capa: *Marco Aurélio C. de Pinho Pessoa Filho*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Sousa*

Alexandre Moreira Veloso

1ª edição

1ª impressão (2010): tiragem 100 exemplares

Edição online (2010)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

P475m Pessoa Filho, Marco Aurélio Caldas de Pinho.
Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado / Marco Aurélio Caldas de Pinho Pessoa Filho – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2010.
29 p. — (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, ISSN online 2176-5081 ; 284).

1. Cerrado. 2. Solo. 3. Metagenômica. I. Título. II. Série.

631.4 - CDD 21

© Embrapa 2010

Autor

Marco Aurélio Caldas de Pinho Pessoa Filho

Biólogo, Ph.D.

Pesquisador da Embrapa Cerrados

marco.pessoa@cpac.embrapa.br

Apresentação

O conhecimento sobre a composição e a fisiologia de comunidades microbianas no solo pode ter grande impacto no delineamento de estratégias de recuperação de áreas degradadas e na descoberta de genes e produtos de interesse biotecnológico. Há até poucos anos, pouco era conhecido sobre comunidades microbianas associadas a solos ultramáficos (caracterizados pelo excesso de metais como o níquel, e a baixa disponibilidade de nutrientes), seja sob vegetação nativa, ou sob condições extremas de degradação. Por isso, é grande o potencial de descoberta de mecanismos fisiológicos de resistência ao excesso de metais característico desses ambientes.

Microrganismos são fontes potenciais de enzimas utilizadas pela indústria, e de vários outros produtos de interesse biotecnológico. Entretanto, métodos tradicionais de isolamento subestimam a ampla diversidade microbiana presente nos mais distintos ambientes. Enzimas microbianas que conferem resistência a metais têm importância biotecnológica e ambiental a partir de seus usos potenciais em processos de biorremediação através do uso de isolados naturais ou modificados geneticamente. Além disso, a associação de bactérias adaptadas a ambientes ultramáficos, ou da utilização de seus genes, com plantas hiperacumuladoras de metais apresentam uma potencial aplicação na recuperação de ecossistemas contaminados com excesso de metais.

Este trabalho apresenta as bases da aplicação de uma abordagem independente de cultivo no estudo de recursos genéticos microbianos presentes nas áreas de mineração do maciço ultramáfico de Barro Alto (GO). Tal abordagem está sendo utilizada no Projeto Diversidade e Prospecção de Genes Bacterianos Envolvidos com Tolerância a Níquel na Rizosfera de Plantas Adaptadas a Solos Ultramáficos (Embrapa Macroprograma 3), iniciado em 2010, e liderado pela Embrapa Cerrados.

José Robson Bezerra Sereno
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução.....	9
Diversidade Microbiana – mudanças de paradigma	11
Metagenômica – genômica aplicada a amostras ambientais	14
Metagenômica em Solos Ultramáficos.....	18
Considerações Finais	23
Referências	25
Abstract.....	29

Metagenômica e sua Aplicação no Estudo de Diversidade e Função de Microrganismos de Solos do Cerrado

Marco Aurélio Caldas de Pinho Pessoa Filho

Introdução

O conhecimento sobre a composição e a fisiologia de comunidades microbianas no solo pode ter grande impacto no delineamento de estratégias de recuperação de áreas degradadas e na descoberta de genes e produtos de interesse biotecnológico. Há até poucos anos, pouco era conhecido sobre comunidades microbianas associadas a solos ultramáficos (caracterizados pelo excesso de metais como o níquel, e a baixa disponibilidade de nutrientes), seja sob vegetação nativa, ou sob condições extremas de degradação. Por esse motivo, é grande o potencial de descoberta de mecanismos fisiológicos de resistência ao excesso de metais característico destes ambientes.

No âmbito do Projeto Relações entre Metais do Solo e a Biodiversidade no Cerrado: ferramentas para a conservação ambiental e recuperação de áreas degradadas (Embrapa Macroprograma 2), foi proposta a avaliação do impacto das atividades de mineração no maciço ultramáfico de Barro Alto (GO) na qualidade do solo e das águas da região. O projeto contém componentes de avaliação da riqueza microbiana do solo, e em conjunto com o Projeto Diagnóstico, Monitoramento e Recuperação de Áreas Impactadas pela Mineração de Níquel na Bacia do Alto Tocantins (MCT/CNPq/CT-Agronegócio/CT-Hidro/MAPA-SDCSPA E N° 44/2008), objetiva o desenvolvimento de técnicas inovadoras de recuperação de áreas degradadas no maciço

ultramáfico de Goiás a partir do levantamento de dados sobre fatores edáficos, florísticos e microbiológicos, e sua aplicação na recuperação e no monitoramento dessas áreas. Tais iniciativas tiveram origem com os projetos Distribuição e Biodisponibilidade dos Metais Pesados em Solos de Uso Agrícola do Planalto Central (MCT/CNPq/CT-Agronegócio Universal 01/2002), e Avaliação Ambiental em Área de Mineração de Níquel no Brasil: perspectivas para remediação e sustentabilidade (MCT/CNPq/CT- Mineral nº 20/2006), que foram pioneiros na Embrapa Cerrados na geração de conhecimento sobre o solo da região de Barro Alto (GO), e no estudo da interação vegetação-solo.

Microrganismos são fontes potenciais de enzimas utilizadas pela indústria, e de vários outros produtos de interesse biotecnológico. Entretanto, métodos tradicionais de isolamento subestimam a ampla diversidade microbiana presente nos mais distintos ambientes. Enzimas microbianas que conferem resistência a metais têm importância biotecnológica e ambiental a partir de seus usos potenciais em processos de biorremediação através da utilização de isolados naturais ou modificados geneticamente. Além disso, a associação de bactérias adaptadas a ambientes ultramáficos, ou da utilização de seus genes, com plantas hiperacumuladoras de metais apresentam a potencial aplicação na recuperação de ecossistemas contaminados com excesso de metais.

Este trabalho apresenta as bases da aplicação de uma abordagem independente de cultivo no estudo de recursos genéticos microbianos presentes nas áreas de mineração do maciço ultramáfico de Barro Alto (GO). Tal abordagem está sendo utilizada no Projeto Diversidade e Prospecção de Genes Bacterianos Envolvidos com Tolerância a Níquel na Rizosfera de Plantas Adaptadas a Solos Ultramáficos (Embrapa Macroprograma 3), iniciado em 2010, e liderado pela Embrapa Cerrados.

O projeto visa contribuir (i) na geração de dados sobre a estrutura e a fisiologia de comunidades bacterianas presentes nas áreas estudadas pelos projetos citados; e (ii) na prospecção de genes de interesse biotecnológico envolvidos com mecanismos de tolerância a níquel em bactérias. Espera-se atingir esses objetivos aliando-se técnicas tradicionais de isolamento de bactérias à utilização de uma abordagem

avançada em genômica e biotecnologia microbiana, independente de cultivo, e hoje amplamente empregada por grupos de pesquisa de ponta em diversos países: a metagenômica. Uma breve revisão sobre essa metodologia e sua aplicação no estudo da microbiota de solos ultramáficos é apresentada a seguir.

Diversidade Microbiana – mudanças de paradigma

Por muito tempo, microbiologistas ignoraram o desafio de identificar e caracterizar organismos não cultiváveis. Entre os anos 1960 e 1970, essa missão foi deixada nas mãos de alguns cientistas que persistiam em acumular informações que sugeriam que meios de cultura não capturavam o espectro completo da diversidade microbiana.

As raízes da microbiologia estão associadas ao advento da microscopia, com o primeiro relato da visualização de uma célula bacteriana datando de 1663, por Antonie van Leeuwenhoek. Por 200 anos, o microscópio permitiu a visualização de bactérias heterotróficas, autotróficas, ou de parasitas obrigatórios. A primeira mudança de paradigma em microbiologia surgiu com os trabalhos de Robert Koch. A partir dos anos 1880, seus postulados e sua inovação no desenvolvimento de meios de cultura levaram à divisão do mundo microbiológico em cultivável e não cultivável. O interesse de pesquisadores foi dedicado ao estudo de bactérias mantidas em cultura pura, gerando a considerável quantidade de informações contidas em livros-texto de microbiologia (HANDELSMAN, 2004).

Levantamentos sobre a atividade de microrganismos aquáticos não fotossintéticos evidenciaram que grande parte do mundo microbiano não era representada pelos organismos cultiváveis (STALEY; KONOPKA, 1985). Resultados indicavam uma grande discrepância entre os tamanhos populacionais estimados por diferentes métodos de quantificação. Esse fenômeno ficou conhecido como “a grande anomalia em contagem em placas”. Era comum o relato de valores muito maiores de células bacterianas por contagem microscópica

direta do que por contagem em placa de cultivo. Especulava-se que as bactérias que não cresciam em meio de cultura não eram viáveis, ou como alternativa, que elas poderiam ser consideradas vivas, mas incapazes de crescer sob as condições fornecidas pelo procedimento de cultivo (STALEY; KONOPKA, 1985). Em ambientes como o solo, os valores chegavam de 0,1% a 1% de bactérias presentes no ambiente que poderiam ser cultivadas em meios de uso padrão (TORSVIK et al., 1990).

Uma nova mudança de paradigma aconteceu em 1985, com um grande avanço experimental baseado no trabalho pioneiro de Carl Woese, que demonstrou que genes do RNA ribossomal (rRNA) poderiam ser utilizados como ferramentas de medida de divergência evolutiva (WOESE, 1987). A análise direta das sequências dos genes rRNA 5S e 16S foi utilizada para a descrição da diversidade de microrganismos em uma amostra ambiental, sem isolamento ou cultivo (LANE et al., 1985). Essa metodologia ficou conhecida como filotipagem. Na época, essa abordagem apresentava o grande desafio técnico de se trabalhar com sequenciamento direto de RNA ou de cópias de DNA geradas por transcriptase reversa. O desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o desenho de iniciadores que poderiam ser utilizados na amplificação do gene ribossomal aceleraram a descoberta de novos táxons nos mais diversos ambientes terrestres (HANDELSMAN, 2004).

A partir daí, diferentes técnicas moleculares foram desenvolvidas empregando o gene ribossomal bacteriano como marcador de diversidade filogenética. A amplificação da região 16S a partir de uma amostra ambiental, com iniciadores conservados, foi seguida da utilização de técnicas como eletroforese em agarose ou poliacrilamida, eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER et al., 1993), ou eletroforese capilar.

A amplificação da região espaçadora entre as unidades 16S e 23S (a região ITS) também foi utilizada como forma de se estimar diversidade entre táxons mais próximos, devido a sua maior taxa de mutação e

maiores níveis de diversidade de sequência. Essa tecnologia ficou conhecida como RISA (do inglês *rRNA internal spacer analysis*, análise do espaçador interno do rRNA) (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997). Os autores utilizaram dados de variabilidade da região espaçadora em comunidades microbianas do solo da Amazônia Ocidental para a análise do impacto da ação humana nessas regiões. Seus resultados mostraram que existe uma mudança efetiva na diversidade de uma área de floresta quando comparada a uma área recentemente desflorestada e convertida em pastagem. A utilização de iniciadores marcados com fluorescência foi atualizada para sua aplicação em alta escala (ARISA, do inglês *automated RISA*, RISA automatizado), através da separação de produtos por eletroforese capilar e detecção de fragmentos a laser, em sequenciadores automáticos (HARTMANN et al., 2005).

A posterior fragmentação do amplicon por enzimas de restrição (ARDRA, análise de restrição do DNA ribossomal amplificado) também foi implementada como ferramenta molecular de análise de diversidade bacteriana. A técnica é, na verdade, uma variação do RFLP (*restriction fragment length polymorphism*, polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição), e envolve a fragmentação – por uma ou várias enzimas de restrição – do fragmento ribossomal amplificado, seja ele 16S, 23S, ou espaçador, dependendo do tipo de aplicação desejado (REIS JR et al., 2002).

A inclusão de um passo de clonagem de fragmentos de DNA “ambiental” em um hospedeiro cultivável levou ao surgimento de uma nova linha de pesquisa em diversidade microbiana e na biotecnologia de microrganismos. A análise genômica de uma população de microrganismos surgiu como peça-chave de um novo avanço na pesquisa em microbiologia. Assim, capturado para estudo e preservação, DNA microbiano poderia ser utilizado na busca de informações sobre a fisiologia e a genética de organismos não cultiváveis (HANDELSMAN, 2004). A esse novo *insight* no mundo das bactérias não cultiváveis foi dado o nome de metagenômica.

Metagenômica – genômica aplicada a amostras ambientais

Na última década, a evolução dos estudos em microbiologia ambiental, utilizando métodos independentes de cultivo, permitiu o estabelecimento de uma nova abordagem no estudo de diversidade, genômica e função gênica em microrganismos ditos “não cultiváveis”. Como alternativa para a busca de novos produtos naturais provenientes de microrganismos do solo, foi proposta a estratégia de clonagem do metagenoma (o DNA total de microrganismos presentes em um determinado ambiente), para se acessar o genoma coletivo e o maquinário biossintético da microbiota de solo (HANDELSMAN et al., 1998).

O primeiro relato de clonagem de DNA diretamente extraído e purificado de amostras ambientais foi feito em uma análise de comunidades microbianas marinhas (SCHMIDT et al., 1991). Este trabalho tratava da amplificação e clonagem do gene 16S, e posterior sequenciamento de clones dessa biblioteca, permitindo um levantamento da diversidade filogenética das populações de picoplâncton marinho. Posteriormente, a construção de uma biblioteca metagenômica a partir de uma mistura de organismos enriquecidos em gramíneas ressecadas em laboratório permitiu a detecção de clones que expressavam atividade celulolítica (HEALY et al., 1995). A partir daí, foram estabelecidas as bases de dois dos componentes principais da pesquisa em metagenômica: a análise de diversidade microbiana da fração não cultivável de organismos e a análise funcional de genes de organismos presentes em um ambiente de interesse, independente do cultivo destes.

O termo metagenômica foi descrito pela primeira vez por Jo Handelsman, da Universidade de Wisconsin (EUA), a partir da sugestão de uma série de procedimentos para acessar o metabolismo de microrganismos desconhecidos no solo. Seu propósito era avançar a pesquisa em produtos naturais. Partindo do pressuposto de que a grande maioria dos microrganismos de solo nunca foi isolada nem cultivada em laboratório, foi sugerido que esse ambiente poderia constituir a maior fonte de recursos ainda intocados para a química de produtos naturais (HANDELSMAN et al., 1998). A metodologia

sugerida seria a clonagem de metagenomas a fim de se acessar os genomas coletivos e o maquinário biossintético da microbiota de solos.

Em linhas gerais, análises metagenômicas consistem no isolamento de DNA proveniente de uma amostra ambiental, fragmentação e inserção do DNA em um vetor adequado, transformação de um hospedeiro bacteriano, e *screening* das células recombinantes. Os clones podem ser avaliados quanto à presença de marcadores filogenéticos (conhecidos como âncoras), tais como o próprio gene rRNA 16S ou o gene *recA*, ou de outros genes conservados. Também podem ser testados quanto à expressão de fenótipos ou características específicas, tais como atividades enzimáticas ou a produção de antibióticos. Por fim, outra possibilidade é o sequenciamento aleatório de clones da biblioteca (HANDELSMAN, 2004). Na Figura 1, mostra-se um organograma clássico em projetos de metagenômica.

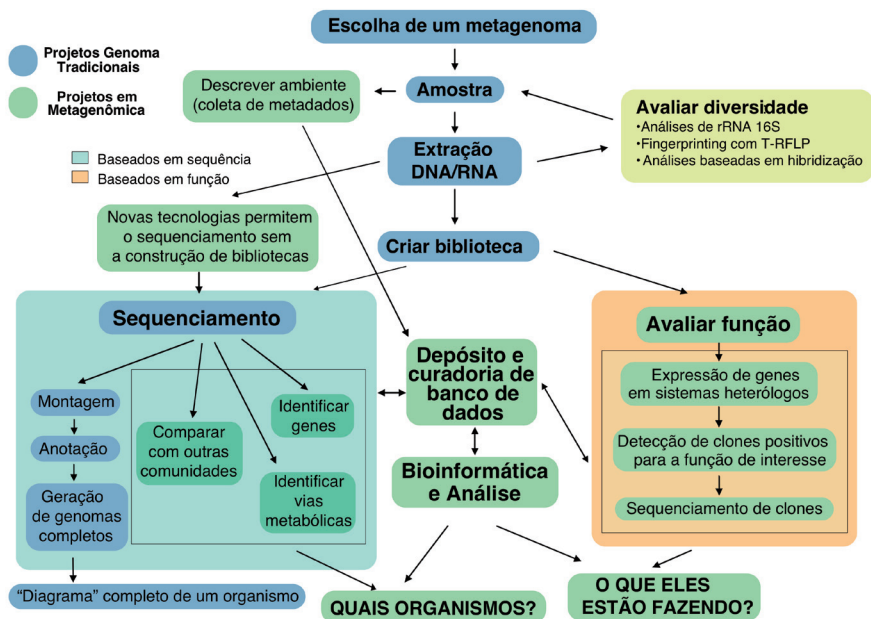


Figura 1. Fluxograma comparativo de projetos genoma tradicionais e projetos em metagenômica.

Em termos práticos, as diversas abordagens que compõem o que se chama hoje de metagenômica incluem a caracterização de comunidades microbianas ou seus membros, por métodos independentes de cultivo, aplicando técnicas de análise em alta escala (ferramentas da genômica, proteômica, transcriptômica, etc.) (RESEARCH COUNCIL (U.S.). COMMITTEE ON METAGENOMICS: CHALLENGES AND FUNCTIONAL APPLICATIONS, 2007).

Dessa forma, duas estratégias são mais frequentemente utilizadas na busca de alvos funcionais presentes em bibliotecas metagenômicas, sendo possível dividir os estudos nos seguintes tipos de abordagens: *screenings* baseados em análise funcional e *screenings* baseados em sequenciamento.

Uma abordagem baseada em função gênica busca por clones que expressam a característica de interesse nas bibliotecas construídas. A partir da seleção de clones positivos, é possível a obtenção de informações acerca do controle genético da característica em estudo. Isso pode ser realizado por subclonagem e sequenciamento do fragmento metagenômico inserido no vetor de expressão, e posterior anotação gênica para definição das ORFs (*open reading frames*, fases abertas de leitura, sequências de DNA que potencialmente codificam um peptídeo ou proteína) presentes no fragmento clonado (MIRETE et al., 2007). Uma das vantagens desse tipo de estratégia está na possibilidade de se capturar clones com potencial aplicação direta – por exemplo, na descoberta de enzimas de interesse biotecnológico para a indústria. Outra vantagem é a chance de descoberta de sequências funcionais não descritas em estudos anteriores, com papéis distintos de biocatalisadores já conhecidos (YUN; RYU, 2005).

Outrossim, para que os fragmentos metagenômicos inseridos nos hospedeiros de expressão (por exemplo, *E. coli*), possibilitem a detecção de clones positivos para a característica de interesse na biblioteca, é preciso que a os genes contidos nos fragmentos sejam corretamente transcritos, traduzidos e que as enzimas sintetizadas sejam biologicamente funcionais. Além disso, caso a função biológica

exija a expressão de múltiplos genes, é necessária a presença de todos os genes da via em questão, para que essa seja identificada. Em uma situação em que centenas ou milhares de clones precisam ser avaliados, essa estratégia exige o estabelecimento de métodos eficientes e econômicos para que a avaliação seja feita em alta escala (YUN; RYU, 2005).

Os primeiros estudos que utilizaram um *screening* baseado em sequência fizeram uso de hibridização ou PCR para a detecção de genes de interesse, tendo como referência sequências de DNA conservadas. Assim, tal estratégia não poderia ser aplicada para um número grande de alvos, e também não garantiria a obtenção de genes completos, ou grupos gênicos necessários para a síntese de um produto desejado. Apesar de já ter sido utilizada na descoberta de várias enzimas de importância industrial, a aplicação típica para esse tipo de abordagem acabou sendo a amplificação de genes ribossomais em estudos de diversidade filogenética (YUN; RYU, 2005).

Estudos de sequenciamento de bibliotecas metagenômicas têm feito uso de sequenciamento *shotgun* e, mais recentemente, sequenciamento de nova geração (como por exemplo, pirosequenciamento). Essas metodologias fornecem uma grande quantidade de informação, desde relações filogenéticas, descoberta de novos genes e dedução de vias metabólicas em bactérias não cultiváveis. A quantidade de dados leva a análises laboriosas para as quais novos paradigmas de estudo empregando bioinformática ainda estão sendo estabelecidos.

Tanto os estudos baseados em prospecção de função, quanto os estudos que fazem uso de sequenciamento de DNA apresentam uma baixa frequência de detecção de clones positivos (tão baixas quanto 4 clones positivos em 930.000 clones avaliados) (HENNE et al., 2000). Várias estratégias foram implementadas para aumentar a eficiência no *screening*. Entre elas, o uso de organismos hospedeiros como *Streptomyces lividnas* ou *Pseudomonas putida* além de *E. coli* a fim de se superar as limitações e dificuldades da expressão heteróloga do metabolismo secundários (KOMATSU et al., 2010). Etapas de

enriquecimento de microrganismos não cultiváveis que contêm as características de interesse também têm sido empregadas antes da construção de bibliotecas metagenômicas (ENTCHEVA et al., 2001). O objetivo desse processo é aumentar a quantidade de DNA de boa qualidade de organismos relacionados com um fenótipo de interesse. No artigo citado, Entcheva et al. (2001) utilizaram altas quantidades de avidina nos meios de cultura, a fim de favorecer o crescimento de microrganismos produtores de biotina. O DNA extraído das culturas enriquecidas foi utilizado na construção de bibliotecas de cosmídeos com insertos maiores que 30.000 pb.

Metagenômica em Solos Ultramáficos

Solos ultramáficos (ou serpentínicos) apresentam excesso de metais potencialmente tóxicos, tais como cobalto, cromo e, principalmente, níquel, além de baixa disponibilidade de nutrientes, como cálcio e fósforo, apresentando forte desequilíbrio mineral. Essas características levam à ocorrência de uma gama de espécies endêmicas adaptadas a condições extremas, e à presença de mecanismos fisiológicos vegetais distintos, como a hiperacumulação de metais (BAKER et al., 2000, BROOKS, 1987, JAFFRE et al., 1976, LEE et al., 1977). Entre os metais, o níquel é provavelmente o que causa os maiores efeitos de toxicidade a plantas não adaptadas. A biodisponibilidade de níquel, em geral, é suficiente para criar estresse fisiológico na maioria das plantas que crescem nesse tipo de solo (RAJKUMAR et al., 2009).

Ambientes ultramáficos têm sido estudados no mundo inteiro quanto a suas composições florísticas, edáficas e fisiológicas (REEVES et al., 2007). Apesar disso, há até poucos anos, a microbiologia desses ambientes era pouco conhecida (OLINE, 2006). A microbiota desse tipo de solo provavelmente exhibe fortes respostas evolutivas e fisiológicas às condições ambientais locais, compondo comunidades com características biológicas tão interessantes quanto às populações endêmicas de plantas presentes em maciços ultramáficos. Isso se deve ao contato direto da microbiota com a composição e as propriedades

químicas únicas desses ambientes, e com a rizosfera de plantas tolerantes e (ou) hiperacumuladoras de níquel (OLINE, 2006).

A hiperacumulação de metais depende não só da planta, mas também da interação do tecido radicular com microrganismos da rizosfera, e das concentrações de metais biodisponíveis no solo (RAJKUMAR et al., 2009). O papel de bactérias no crescimento de plantas adaptadas a solos ultramáficos é significativo através de mecanismos como a fixação de nitrogênio atmosférico, a utilização de ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano (ACC) como a única fonte de nitrogênio, a produção de sideróforos, ou a produção de hormônios reguladores do crescimento de plantas (RAJKUMAR et al., 2009). Vários microrganismos de solos serpentínicos são capazes de solubilizar formas não disponíveis de metais através da excreção de ácidos orgânicos (RAJKUMAR et al., 2009). Isolados de solos ultramáficos, resistentes a altas concentrações de metais, aumentam a eficiência de processos como a fitoextração de forma direta por meio de um maior acúmulo de metais nos tecidos da planta, e de forma indireta por meio de maior desenvolvimento de biomassa radicular e de parte aérea de hiperacumuladoras (RAJKUMAR et al., 2009).

No Brasil, complexos ultramáficos no Estado de Goiás possuem grande importância econômica em razão da intensa atividade de mineração nessas áreas, desde o final dos anos 1970. As reservas são estimadas em 100 milhões de toneladas de níquel extraível (equivalente a 2 milhões de toneladas de níquel metálico), e as operações de mineração resultaram na degradação de extensas áreas de vegetação natural. Expedições de prospecção florística têm sido realizadas desde o final dos anos 1980 (BROOKS et al., 1992, BROOKS et al., 1990, REEVES et al., 2007), sendo relatadas várias espécies com capacidade hiperacumuladora de níquel. Além disso, a identidade exata de somente 13 espécies vegetais foi determinada, de um total de 79 espécimes coletados, com potencial presença de mais de 30 espécies diferentes (REEVES et al., 2007). Dada a potencial exposição desses ambientes à fortíssima degradação ambiental, projetos que proponham levantamentos sobre flora, macrofauna, microbiologia de solos, e o

conhecimento sobre fatores edáficos e biogeoquímicos, visando ao desenvolvimento de técnicas inovadoras de recuperação dessas áreas após as atividades de mineração, são de extrema importância na manutenção da sustentabilidade da atividade mineradora no Cerrado.

Alguns trabalhos têm tratado do estudo das bactérias presentes em solos ultramáficos, e das suas interações com plantas hiperacumuladoras de níquel (ABOU-SHANAB et al., 2003, ABOU-SHANAB et al., 2007, MENGONI et al., 2001, SCHLEGEL et al., 1991). Comunidades bacterianas presentes em solos ultramáficos têm uma maior tolerância a altos níveis de níquel e zinco, quando comparadas com comunidades bacterianas de solos não serpentínicos. Há, também, evidência da influência da rizosfera de plantas hiperacumuladoras como *Sebertia acuminata*, *Thlaspi caerulescens*, *Alyssum bertolonii* e *Alyssum murale*, na maior incidência de bactérias expressando resistência a metais (ABOU-SHANAB et al., 2007). Alguns tipos de metais como cobalto, cobre, níquel e zinco possuem um papel essencial no metabolismo celular de bactérias, quando presentes em concentrações baixas, sendo potencialmente tóxicas em altas concentrações. Outros metais pesados, como chumbo, cádmio, prata e cromo, são tóxicos até quando em concentração muito baixa (NIES, 2004).

Mecanismos metabólicos relacionados com a tolerância a metais foram descritos em vários microrganismos: eles envolvem sua exclusão, remoção ativa, biossorção, precipitação ou bioacumulação em espaços intra ou extracelulares. Esses processos podem influenciar a solubilidade e a biodisponibilidade de metais para a planta, modificando os efeitos tóxicos dos metais (RAJKUMAR et al., 2009). O estresse abiótico causado por metais pesados, em suas formas orgânicas ou inorgânicas, afeta o crescimento, a morfologia e o metabolismo de microrganismos no solo (RAJKUMAR et al., 2009). Os mecanismos mais conhecidos de resistência a níquel são mediados por bombas de fluxo como a *CnrCBA* (resistência a cobalto-níquel) de *Cupriavidus metallidurans* CH34; *NccCBA* (níquel-cobalto-cádmio)

e *NreB* (resistência a níquel) de *Achromobacter xylosoxidans* 31A; um homólogo de *NreB*, o gene *NrsD*, de *Synechocystis* sp.; *YohM* (resistente a cobalto-níquel) de *E. coli*; e *CznABC* (cádmio-zinco-níquel) de *Helicobacter pylori*. Todos esses foram isolados por técnicas dependentes de cultivo, havendo a grande possibilidade da presença de novos mecanismos na natureza (MIRETE et al., 2007). As regiões do genoma bacteriano relacionadas com respostas ao excesso de metais pesados podem ser codificados por genes cromossomais, porém estão mais frequentemente localizados em plasmídeos bacterianos (CERVANTES; GUTIERREZ-CORONA, 1994).

Nos maciços ultramáficos de Barro Alto (GO), levantamentos florísticos e fisiológicos recentes de plantas nativas hiperacumuladoras e (ou) tolerantes ao excesso de níquel foram relatados por Reeves et al. (2007). Resultados desse trabalho e dos projetos em andamento – Relações entre Metais do Solo e a Biodiversidade no Cerrado: ferramentas para a conservação ambiental e recuperação de áreas degradadas (Embrapa Macroprograma 2); Diagnóstico, Monitoramento e Recuperação de Áreas Impactadas pela Mineração de Níquel na Bacia do Alto Tocantins (MCT/CNPq/CT-Agronegócio/CT- Hidro/MAPA-SDCSPA E N° 44/2008); e Avaliação Ambiental em Área de Mineração de Níquel no Brasil: perspectivas para remediação e sustentabilidade (MCT/CNPq/CT-Mineral n° 20/2006) – sugerem uma série de espécies vegetais hiperacumuladoras de níquel com potencial para estudos bioquímicos, fisiológicos e moleculares quanto à resistência e ao hiperacúmulo de níquel. Entre estas, a espécie *Heliotropium salicoides* (família Boraginaceae) mostra altos níveis de níquel em tecido foliar, chegando a 2.015 mg de níquel por kg de tecido (REEVES et al., 2007). Variações detectadas nas concentrações de níquel foliar em indivíduos da mesma espécie, presentes em regiões distintas (concentração mínima de 7 mg/kg e máxima de 2.015 mg/kg, para *Heliotropium salicoides*), deixam em aberto a questão sobre a causa dessas variações. Fatores como condições de solo quanto à biodisponibilidade de níquel, ou como a própria diversidade genética da espécie em relação quanto a essa característica, podem ser levados

em consideração. É interessante notar que os autores enfatizam a necessidade de estudos sobre microbiologia de solos e sobre fungos micorrízicos interagindo com o sistema radicular dessas plantas, para que tais perguntas sejam respondidas (REEVES et al., 2007).

Nesse sentido, o Projeto Diversidade e Prospecção de Genes Bacterianos Envolvidos com Tolerância a Níquel na Rizosfera de Plantas Adaptadas a Solos Ultramáficos (Embrapa Macroprograma 3), iniciado em 2010, propõe, primeiro, a avaliação dos efeitos de alterações na biodisponibilidade de níquel e da atividade mineradora na diversidade bacteriana. Por diversidade bacteriana, entende-se a composição global de filós de Bactéria presentes nas áreas em estudo, por sequenciamento de bibliotecas de rRNA 16S montadas a partir de DNA metagenômico. Segundo, por meio da prospecção de genes bacterianos envolvidos com tolerância a níquel presentes no genoma de bactérias cultiváveis – isoladas por métodos tradicionais de cultivo – e não-cultiváveis – analisados por uma abordagem de metagenômica funcional.

O projeto tem como objetivo geral caracterizar recursos genéticos bacterianos quanto à sua diversidade e seus mecanismos de tolerância ao níquel em solos do maciço ultramáfico de Barro Alto (GO), diante de gradientes na biodisponibilidade de níquel e do efeito da atividade de mineração.

Recentemente, uma abordagem metagenômica foi utilizada para a descoberta de mecanismos metabólicos relacionados com a resistência ao excesso de níquel em uma população bacteriana de rizosfera de *Erica andevalensis* (MIRETE et al., 2007), presentes em áreas de oxidação de sulfetos minerais, ricas em metais tóxicos e altamente ácidas. O artigo apresenta o primeiro relato sobre a descoberta de genes de resistência a níquel a partir de uma comunidade microbiana desse tipo de ambiente. Inicialmente, o trabalho incluiu a análise de diversidade de populações microbianas através de clonagem e sequenciamento da região 16S de uma amostra de DNA metagenômico – DNA total extraído de solo de rizosfera de *E. andevalensis*. Essa primeira etapa teve como objetivo determinar a representatividade em termos de riqueza

microbiana contida no material amostrado. Posteriormente, fragmentos de DNA metagenômico foram clonados em *E. coli*, e a biblioteca foi prospectada em relação à ocorrência do fenótipo de interesse (no caso, *E. coli* transformadas resistentes ao excesso de níquel em meio de cultura). Após a seleção de clones positivos, os insertos foram sequenciados e anotados quanto à presença de ORFs relacionadas com mecanismos metabólicos de tolerância a níquel. A validação de função dos insertos foi realizada por subclonagem ou por mutagênese. Genes já conhecidamente envolvidos com resistência a níquel foram detectados, e de um total de 13 clones positivos, cinco codificavam proteínas já conhecidas, porém nunca associadas à resistência à níquel, enquanto seis clones codificavam proteínas hipotéticas ou de função desconhecida. Entre as ORFs descritas, foi relatado um provável novo grupo de transportadores ABC relacionados com a retirada de metais da célula. Este trabalho demonstra a possibilidade de aplicação de abordagens recentes em microbiologia ambiental, associando genômica avançada em alta escala, prospecção de função gênica, além da análise em alta escala de diversidade de populações microbianas – nesse último caso, abordagem já aplicada em solo de Cerrado para comunidades bacterianas e fúngicas (DE CASTRO et al., 2008, QUIRINO et al., 2009).

Considerações Finais

O potencial de uso da metagenômica em diferentes objetos de pesquisa é enorme, mas o conhecimento de suas limitações permite um uso racional de suas metodologias e um melhor planejamento de futuros projetos. Abordagens que fazem uso de uma triagem funcional dependem da expressão bem sucedida de genes clonados na bactéria hospedeira, conforme já mencionado anteriormente. Em triagens baseadas em sequenciamento, não é possível a obtenção de genes completamente novos. Isso ocorre porque a inferência sobre a função gênica a partir de sequências obtidas nesses tipos de estudo dependem da presença prévia de genes anotados em bancos de dados. Além disso, podem ocorrer a clonagem de genes parciais e a seleção de genes não funcionais (DANIEL, 2005).

O pesquisador deve ter em mente que o valor de predição e interpretação de dados em metagenômica é limitado pela validade e da representatividade da informação presente em banco de dados. A quantidade de genes listados com função desconhecida é enorme, e para aqueles genes com função inferida a partir de análises de similaridade, ainda é necessária validação experimental. Nesse sentido, o progresso no cultivo de bactérias antes não cultiváveis, a fim de se obter representantes isolados do ambiente em estudo, é de extremo valor. Dessa forma, a metagenômica deve ser recebida como uma metodologia complementar a abordagens tradicionais em testes de hipótese sobre a composição, diversidade e funcionalidade de comunidades microbianas (LEVEAU, 2007). Finalmente, a metagenômica não se sustenta somente com dados genômicos gerados em laboratório: a abordagem é multidisciplinar e envolve a coleta de informações sobre o ambiente em estudo – dados como química e física do solo, e vegetação presente na área, por exemplo – que devem ser analisados em conjunto com os dados gerados sobre diversidade e função gênica.

A mudança de paradigmas de sequenciamento que tem ocorrido nos últimos anos também é um fator limitante de abordagens que geram quantidades exorbitantes de informação. Serão necessários avanços em bioinformática diante da adaptação à enorme quantidade de dados de sequenciamento gerados. Em razão da inexistência de pacotes para análise global de dados, devem ser levados em conta, em projetos de metagenômica, a complexidade da amostra e a difícil montagem de genomas a partir de amostras complexas. Vale salientar que o progresso e desenvolvimento em bioinformática atenderam a projetos que utilizavam a tecnologia de sequenciamento de Sanger, sendo necessária uma renovação e adequação de processos e metodologias que atendam projetos futuros (CHEN; PACHTER, 2005, KUNIN et al., 2008, RESEARCH COUNCIL (U.S.). COMMITTEE ON METAGENOMICS: CHALLENGES AND FUNCTIONAL APPLICATIONS, 2007).

O Projeto Diversidade e Prospecção de Genes Bacterianos Envolvidos com Tolerância a Níquel na Rizosfera de Plantas Adaptadas a Solos Ultramáficos (Embrapa Macroprograma 3) faz uso de técnicas

moleculares avançadas em análises de comunidades microbianas e na exploração biotecnológica de microrganismos, ainda não realizadas na Embrapa Cerrados. Assim, espera-se um avanço na capacitação do corpo técnico do Centro a partir da utilização de ferramentas moleculares na caracterização e utilização biotecnológica de recursos genéticos microbianos. Finalmente, ele estabelece bases para estudos futuros de prospecção de genes de interesse biotecnológico na microbiota dos Cerrados, relacionados com estresses abióticos como o excesso de metais, e com a baixa disponibilidade de nutrientes, característica dos solos desse bioma.

Diante da linha temática na qual se inclui, o projeto faz uso de tecnologias avançadas em genômica microbiana a fim de gerar conhecimento sobre mecanismos de tolerância a um estresse abiótico – a tolerância a metais. O conhecimento gerado pelo alcance dos objetivos da proposta tem potencial aplicação futura na redução de impactos ambientais da atividade mineradora no Cerrado.

Referências

- ABOU-SHANAB, R. A.; ANGLE, J. S.; DELORME, T. A.; CHANEY, R. L.; BERKUM, P. V.; MOAWAD, H.; GHANEM, K.; GHOZLAN, H. A. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. **New Phytologist**, v. 158, n. 1, p. 219-224, 2003.
- ABOU-SHANAB, R. A. I.; VAN BERKUM, P.; ANGLE, J. S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 360-367, 2007.
- BAKER, A. J. M.; MCGRATH, S. P.; REEVES, R. D.; SMITH, J. A. C. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: (Ed.). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Boca Raton - FL: Lewis Publishers, 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils, p. 85-107.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BROOKS, R. R. Serpentine and its vegetation. In: (Ed.). **Ecology, phytogeography and physiology Series**. Portland - OR, 1987. Serpentine and its vegetation

BROOKS, R. R.; REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M. The serpentine vegetation of Goias, Brazil. In: (Ed.). **The vegetation of ultramafic (serpentine) soils**: andover: Intercept Ltd, 1992. p. 67-81

BROOKS, R. R.; REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M.; RIZZO, J. A.; DIAZ FERREIRA, H. The Brazilian serpentine plant expedition (BRASPEX), 1988. **National Geographic Research**, v. 6, p. 205-219, 1990.

CERVANTES, C.; GUTIERREZ-CORONA, F. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 121-138, 1994.

CHEN, K.; PACTHER, L. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 2, p. 106-112, 2005.

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

DE CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G.; KUROKAWA, A. S.; NETO, E. L.; KRÜGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.

ENTCHEVA, P.; LIEBL, W.; JOHANN, A.; HARTSCH, T.; STREIT, W. R. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 89-99, jan, 2001.

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

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, v. 5, n. 10, p. R245-9, Oct., 1998.

HARTMANN, M.; FREY, B.; KÖLLIKER, R.; WIDMER, F. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, n. 3, p. 349-360, 2005.

HEALY, F. G.; RAY, R. M.; ALDRICH, H. C.; WILKIE, A. C.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 667-74, Aug-Sept, 1995.

HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3113-6, jul, 2000.

JAFFRE, T.; BROOKS, R. R.; LEE, J.; REEVES, R. D. *Sebertia acuminata*: A Hyperaccumulator of Nickel from New Caledonia. **Science**, v. 193, n. 4253, p. 579-580, 1976.

KOMATSU, M.; UCHIYAMA, T.; OMURA, S.; CANE, D. E.; IKEDA, H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2646-2651, Feb. 2010.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 557, 2008.

LANE, D.; PACE, B.; OLSEN, G.; STAHL, D.; SOGIN, M.; PACE, N. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, Jan., 1985.

LEE, J.; BROOKS, R. R.; REEVES, R. D.; BOSWELL, C. R.; JAFFRÉ, T. Plant-soil relationships in a new caledonian serpentine flora. **Plant and Soil**, v. 46, n. 3, p. 675-680, 1977.

LEVEAU, J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 279-300, 2007.

MENGONI, A.; BARZANTI, R.; GONNELLI, C.; GABBRIELLI, R.; BAZZICALUPO, M. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 691-698, 2001.

MIRETE, S.; DE FIGUERAS, C. G.; GONZALEZ-PASTOR, J. E. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6001-6011, 2007.

MIRETE, S.; DE FIGUERAS, C. G.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6001-11, Oct., 2007.

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 rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NIES, D. H. Metals and their compounds in the environment: part II. In: (Ed.). **The Elements: essential and toxic effects on microorganisms**. Weinheim, 2004.

OLINE, D. K. Phylogenetic Comparisons of Bacterial Communities from Serpentine and Nonserpentine Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 6965-6971, 2006.

QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; TAGLIAFERRO, A. C.; COLLEVATTI, R. G.; NETO, E. L.; DA SILVA, M. R. S. S.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRÜGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, v. 164, n. 1, p. 59-70, 2009.

- RAJKUMAR, M.; VARA PRASAD, M. N.; FREITAS, H.; AE, N. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 120-130, Jun., 2009.
- REEVES, R.; BAKER, A.; BECQUER, T.; ECHEVARRIA, G.; MIRANDA, Z. The flora and biogeochemistry of the ultramafic soils of Goiás state, Brazil. **Plant and Soil**, v. 293, n. 1, p. 107-119, 2007.
- REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. (Embrapa Cerrados. Documentos, 51).
- RESEARCH COUNCIL (U.S.). COMMITTEE ON METAGENOMICS: CHALLENGES AND FUNCTIONAL APPLICATIONS, N. **The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet**. 2007. 158 p.
- SCHLEGEL, H. G.; COSSON, J. P.; BAKER, A. J. M. Nickel-hyperaccumulating plants provide a niche for nickel-resistant bacteria. **Botanica acta**, v. 104, n. 1, p. 18-25, 1991.
- SCHMIDT, T.; DELONG, E.; PACE, N. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 14, p. 4371, 1991.
- STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Reviews Microbiology**, v. 39, p. 321-46, Jan., 1985.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-7, Mar., 1990.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-71, Jun., 1987.
- YUN, J.; RYU, S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 8, Mar., 2005.

Metagenomics: applications on the study of diversity and function of soil microorganisms in the Cerrado

Abstract

Knowledge on the composition and physiology of soil microbial communities may have a great impact on the establishment of strategies to recover highly degraded areas and on the discovery of genes and biotechnological products. Until recently, little was known about microbial communities associated with ultramafic soils (characterized by excessive concentrations of metals such as nickel, and by their low nutrient availability), either under native vegetation, or under extreme conditions of degradation. Nevertheless, there is a great potential for the discovery of physiological mechanisms related with resistance to excessive concentrations of metals, which characterize such environments. Microorganisms are potential sources of industrial enzymes, and of various other biotechnological products. However, traditional isolation methods underestimate the huge microbial diversity occurring in distinct environments. Microbial enzymes conferring resistance to metals have biotechnological and environmental importance by their potential application for bioremediation by using natural or genetically modified isolates. In addition, the association between bacteria adapted to ultramafic soils, or the use of their genes, and plants presenting metal hyperaccumulation might be useful in the recovery of metal contaminated ecosystems. This paper presents the bases for the application of an isolation-independent approach for the study of microbial genetic resources in mining areas with ultramafic soils in Barro Alto (GO). Such approach is being used in the project Diversity and prospection of bacterial genes involved with nickel tolerance in the rhizosphere of plants adapted to ultramafic soils (Embrapa Macroprograma 3), started in 2010, and lead by Embrapa Cerrados.

Index terms: environmental genomics, nickel tolerance, 16S rRNA.