



Evolução das Metodologias de Estudo da Diversidade Microbiana: Dos Métodos Dependentes de Cultivo às Abordagens Ômicas

Evolution of Methods for Studying Microbial Diversity: From Culture-Dependent Methods to Omics Approaches

Lucio Antonio Rocha Lima

Resumo: A caracterização da diversidade microbiana passou por uma transformação metodológica profunda nas últimas décadas. Abordagens baseadas em cultivo, fundamentais para a descrição fenotípica, fisiológica e funcional de microrganismos, revelam apenas a fração cultivável das comunidades e podem introduzir vieses relacionados ao meio, às condições de incubação e às interações ecológicas. O desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo, como hibridização fluorescente in situ, PCR, DGGE e T-RFLP, ampliou a capacidade de detectar e comparar comunidades diretamente em amostras ambientais. Posteriormente, o sequenciamento de amplicons em larga escala, a inferência de variantes de sequência de amplicons e o avanço da bioinformática permitiram análises taxonômicas mais reprodutíveis e de maior resolução. A metagenômica shotgun, a metatranscriptômica, a metaproteômica e a metabolômica deslocaram o foco da simples descrição taxonômica para a investigação do potencial funcional e da atividade das comunidades. Mais recentemente, o sequenciamento de leituras longas e a recuperação de genomas montados a partir de metagenomas têm aumentado a resolução em nível de espécie e linhagem. Este capítulo revisa a evolução dessas metodologias, discute suas principais aplicações e limitações e apresenta critérios para a seleção de estratégias analíticas em microbiologia ambiental. A tendência contemporânea é a integração entre cultivo, sequenciamento, bioinformática e abordagens multiômicas, reconhecendo que nenhuma técnica isolada descreve integralmente a estrutura e a função de um microbioma.

Palavras-chave: microbioma; diversidade microbiana; sequenciamento; metagenômica; bioinformática.

Abstract: The characterization of microbial diversity has undergone a profound methodological transformation in recent decades. Culture-based approaches remain essential for phenotypic, physiological, and functional characterization, but they reveal only the cultivable fraction of microbial communities and may introduce biases related to growth media, incubation conditions, and ecological interactions. Culture-independent methods such as fluorescence in situ hybridization, PCR, DGGE and T-RFLP expanded the ability to detect and compare microorganisms directly in environmental samples. High-throughput amplicon sequencing, amplicon sequence variant inference and modern bioinformatics subsequently increased taxonomic resolution and reproducibility. Shotgun metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics and metabolomics shifted microbiome research from taxonomic description toward functional potential and activity. More recently, long-read sequencing and metagenome-assembled genomes have improved species- and strain-level resolution. This chapter reviews the evolution of these methods, discusses their applications and limitations, and presents criteria for selecting analytical strategies in environmental microbiology. Current practice

increasingly integrates cultivation, sequencing, bioinformatics, and multi-omics, recognizing that no single method can fully describe the structure and function of a microbiome.

Keywords: microbiome; microbial diversity; sequencing; metagenomics; bioinformatics.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos participam de processos essenciais à manutenção dos ecossistemas, incluindo decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, transformações redox, produção e consumo de gases e degradação de compostos naturais ou antropogênicos. Em ambientes naturais e contaminados, a estrutura das comunidades microbianas pode responder rapidamente a mudanças de disponibilidade de nutrientes, condições físico-químicas e presença de poluentes. Por essa razão, compreender quem está presente, em que abundância e com quais capacidades metabólicas constitui uma questão central da microbiologia ambiental.

Durante grande parte da história da microbiologia, o conhecimento da diversidade microbiana esteve condicionado à capacidade de isolar e cultivar organismos em laboratório. O cultivo permitiu descrever morfologia, fisiologia, metabolismo e interações com substratos, além de produzir linhagens de referência. Entretanto, a dependência de condições artificiais de crescimento limita a fração da comunidade que pode ser recuperada. O próprio trabalho que deu origem a este capítulo enfatizava que métodos de cultivo forneciam uma visão parcial das comunidades e que a biologia molecular ampliava o acesso à diversidade não cultivada.

A evolução metodológica ocorreu em etapas sobrepostas, e não por substituição absoluta. Métodos de cultivo continuaram relevantes enquanto surgiram abordagens baseadas em ácidos nucleicos, inicialmente direcionadas a alvos específicos e posteriormente capazes de gerar milhões de sequências por amostra. A transição de perfis de bandas e sondas específicas para sequenciamento massivo, metagenômica e multiômica alterou tanto a escala quanto o tipo de pergunta possível. Hoje, o desenho experimental deve partir da pergunta biológica e escolher, entre diferentes níveis de resolução, a combinação metodológica mais adequada.

Este capítulo apresenta uma revisão narrativa e atualização conceitual da evolução das metodologias de avaliação da diversidade microbiana, com ênfase em amostras ambientais. São discutidos métodos dependentes de cultivo, técnicas moleculares clássicas, sequenciamento de genes marcadores, metagenômica shotgun, abordagens funcionais, leituras longas, bioinformática e integração multiômica. O objetivo não é estabelecer uma técnica universalmente superior, mas demonstrar como diferentes estratégias respondem a perguntas distintas e possuem vieses próprios.

MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO

O cultivo em meios sólidos ou líquidos foi a base da microbiologia clássica e permanece indispensável quando o objetivo envolve obtenção de biomassa, caracterização fisiológica, testes metabólicos, avaliação de atividade enzimática, determinação de tolerância a contaminantes ou aplicação biotecnológica de linhagens. A seleção de fontes de carbono, nitrogênio, aceptores de elétrons, salinidade, pH, temperatura e condições de oxigenação pode favorecer grupos específicos e permitir o enriquecimento de populações de interesse.

A contagem em placas fornece estimativas de unidades formadoras de colônia e pode ser particularmente útil para acompanhar microrganismos heterotróficos viáveis ao longo de experimentos. Meios seletivos e diferenciais, por sua vez, permitem explorar características metabólicas específicas. Sistemas baseados na utilização de diferentes fontes de carbono, como microplacas de perfil fisiológico, ampliaram a comparação funcional entre isolados e comunidades cultiváveis.

A principal limitação é o viés de cultivabilidade. A ausência de crescimento não significa ausência do organismo na amostra. Dependências metabólicas, crescimento lento, formação de biofilmes, exigências nutricionais desconhecidas e interações entre espécies podem impedir a recuperação em condições laboratoriais. Além disso, organismos de crescimento rápido podem dominar placas e enriquecimentos, produzindo estimativas distorcidas da abundância relativa da comunidade original.

Apesar dessas limitações, a chamada 'era pós-cultivo' não eliminou a importância da cultura. Estratégias contemporâneas de culturomics, cocultivo, meios de baixa concentração de nutrientes, simulação de condições ambientais e dispositivos de cultivo *in situ* procuram recuperar microrganismos antes considerados não cultiváveis. Em estudos aplicados, o isolamento continua sendo necessário para demonstrar experimentalmente funções que dados de sequência apenas sugerem.

MÉTODOS FENOTÍPICOS E FISIOLÓGICOS DE COMUNIDADES

Antes da expansão do sequenciamento, a diversidade de comunidades também foi inferida por perfis metabólicos e componentes celulares. A utilização diferencial de substratos de carbono permitiu comparar capacidades catabólicas entre comunidades, enquanto perfis de ácidos graxos de fosfolípidios foram empregados como marcadores de biomassa e de grandes grupos microbianos. Essas abordagens tiveram importância histórica por permitir comparações quantitativas entre amostras sem depender exclusivamente da identificação taxonômica de isolados.

O valor atual desses métodos está sobretudo na complementaridade. Perfis fisiológicos podem indicar mudanças funcionais que não são diretamente inferíveis da composição taxonômica, enquanto biomarcadores lipídicos podem fornecer estimativas independentes de biomassa. Entretanto, a resolução taxonômica é limitada e diferentes organismos podem compartilhar assinaturas semelhantes.

Assim, seu uso contemporâneo é mais robusto quando integrado a dados moleculares e ambientais.

PRIMEIRAS ABORDAGENS MOLECULARES INDEPENDENTES DE CULTIVO

A introdução de métodos baseados em DNA e RNA permitiu investigar microrganismos diretamente nas amostras, reduzindo a dependência do cultivo. O gene do RNA ribossomal 16S tornou-se um dos principais marcadores para bactérias e arqueias por combinar regiões conservadas, adequadas ao desenho de iniciadores, com regiões variáveis úteis para discriminação taxonômica. Para fungos, regiões do espaçador transcrito interno (ITS) passaram a ser amplamente empregadas como marcadores.

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utiliza sondas oligonucleotídicas marcadas para detectar sequências-alvo em células preservadas. Uma vantagem importante é manter informação espacial e permitir visualização e quantificação de grupos específicos no contexto da amostra. A técnica, porém, exige conhecimento prévio do alvo, desenho adequado de sondas e condições de hibridização suficientemente específicas. Dessa forma, FISH é particularmente poderosa para testar hipóteses direcionadas, mas menos adequada para inventariar diversidade desconhecida.

Métodos de fingerprinting, como DGGE e T-RFLP, representaram uma etapa importante na comparação de comunidades complexas. Na DGGE, fragmentos do mesmo tamanho podem ser separados de acordo com diferenças de sequência e comportamento de desnaturação. Na T-RFLP, amplicons marcados são digeridos por enzimas de restrição e os fragmentos terminais são separados, produzindo perfis comparáveis entre amostras. Essas técnicas permitiram detectar mudanças temporais ou espaciais em comunidades antes que o sequenciamento massivo se tornasse rotineiro.

A principal limitação dos fingerprints é que uma banda ou pico não equivale necessariamente a uma espécie, e diferentes sequências podem apresentar comportamento semelhante. A resolução e a comparabilidade entre estudos também são inferiores às abordagens atuais. Ainda assim, DGGE e T-RFLP tiveram papel metodológico decisivo: estabeleceram a ideia de que comunidades inteiras poderiam ser comparadas diretamente a partir de DNA ambiental.

PCR, QPCR E QUANTIFICAÇÃO DE ALVOS

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou possível amplificar regiões específicas de DNA ambiental em quantidade suficiente para detecção, clonagem e sequenciamento. A escolha dos primers define quais grupos serão observados e constitui uma fonte importante de viés. Diferenças de afinidade, número de cópias

do gene marcador e eficiência de amplificação podem alterar a representação relativa dos táxons.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) acrescentou capacidade de quantificação de genes taxonômicos ou funcionais. Em microbiologia ambiental, pode ser usada para estimar abundância de grupos específicos ou genes associados a processos como nitrificação, desnitrificação, metanogênese, resistência a metais e degradação de contaminantes. Sua principal vantagem é a sensibilidade e a possibilidade de quantificação direcionada; a principal restrição é depender de alvos previamente definidos.

Assim, qPCR e sequenciamento não devem ser tratados como alternativas excludentes. O sequenciamento pode identificar padrões e candidatos, enquanto qPCR pode validar e quantificar alvos específicos em maior número de amostras ou em séries temporais.

SEQUENCIAMENTO DE AMPLICONS E A TRANSIÇÃO DE OTUS PARA ASVS

O sequenciamento de nova geração transformou estudos de diversidade microbiana ao permitir o processamento simultâneo de grande número de amostras e centenas de milhares ou milhões de leituras. Em estudos bacterianos e arqueanos, regiões variáveis do 16S rRNA são amplificadas e sequenciadas; em fungos, o ITS é frequentemente utilizado. A abordagem é relativamente econômica e adequada para comparar composição, riqueza e estrutura de comunidades.

Durante anos, sequências semelhantes foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), frequentemente utilizando limiares arbitrários de similaridade. Métodos de denoising modificaram esse paradigma ao modelar erros de sequenciamento e inferir variantes de sequência de amplicon (ASVs). DADA2, por exemplo, foi desenvolvido para resolver variantes com diferenças de até um nucleotídeo em dados de amplicons Illumina (Callahan *et al.*, 2016). A adoção de ASVs melhora a reprodutibilidade entre conjuntos de dados porque as unidades são definidas por sequências, e não por clusters dependentes do conjunto analisado (Callahan; Mcmurdie; Holmes, 2017).

Plataformas como QIIME 2 integraram controle de qualidade, denoising, taxonomia, diversidade e rastreabilidade da proveniência analítica em fluxos reprodutíveis (Bolyen *et al.*, 2019). Essa evolução da bioinformática foi tão importante quanto o aumento da capacidade de sequenciamento: o volume de dados exige pipelines transparentes, versões documentadas de bancos de referência e decisões explícitas sobre filtragem, profundidade e métodos estatísticos.

O sequenciamento de amplicons, contudo, não equivale à metagenômica shotgun. Ele descreve marcadores selecionados e, portanto, fornece principalmente informação taxonômica. A resolução depende da região amplificada, do comprimento das leituras, da qualidade do banco de referência e da variabilidade do marcador.

Além disso, a abundância relativa de amplicons não é uma medida direta de abundância celular absoluta.

DA TAXONOMIA À FUNÇÃO: INFERÊNCIA E METAGENÔMICA SHOTGUN

Uma consequência natural da expansão dos estudos de microbioma foi a passagem da pergunta ‘quem está presente?’ para ‘o que a comunidade pode fazer?’. Ferramentas de inferência funcional a partir de genes marcadores, como PICRUSt2, estimam repertórios gênicos prováveis com base em relações filogenéticas e genomas de referência. Essas previsões podem ser úteis para gerar hipóteses, mas não devem ser interpretadas como medição direta de genes ou vias na amostra. O próprio desenvolvimento do PICRUSt2 destaca que perfis funcionais não podem ser identificados diretamente a partir do 16S e que a predição possui limitações associadas à disponibilidade e proximidade de genomas de referência (Douglas *et al.*, 2020).

Na metagenômica shotgun, o DNA total da comunidade é fragmentado e sequenciado sem amplificação exclusiva de um marcador taxonômico. Isso permite investigar simultaneamente composição e potencial funcional, identificar genes, reconstruir vias e, quando cobertura e complexidade permitem, montar contigs e recuperar genomas montados a partir de metagenomas (MAGs). A abordagem amplia a resolução, mas aumenta custos, volume computacional e complexidade analítica.

A interpretação funcional também exige cautela. A presença de um gene indica potencial, não necessariamente expressão ou atividade. Além disso, bancos de anotação contêm grande proporção de genes pouco caracterizados, especialmente em ambientes menos estudados. Em microbiomas ambientais altamente diversos, uma parcela relevante das sequências pode permanecer sem atribuição taxonômica ou funcional confiável.

METATRANSCRIPTÔMICA, METAPROTEÔMICA E METABOLÔMICA

A metatranscriptômica analisa o conjunto de RNAs expressos pela comunidade e aproxima a investigação da atividade biológica no momento da amostragem. Em comparação com a metagenômica, que descreve capacidade potencial, o RNA fornece evidência de genes transcritos. Entretanto, o RNA é mais instável, a preservação deve ser rápida e adequada, e a interpretação pode ser influenciada por diferenças na abundância de organismos e na estabilidade dos transcritos.

A metaproteômica investiga proteínas produzidas pela comunidade, enquanto a metabolômica caracteriza pequenas moléculas associadas ao metabolismo. Essas camadas oferecem informação funcional mais próxima do fenótipo, mas apresentam

desafios de extração, identificação e atribuição de moléculas a organismos específicos. A integração entre metagenômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica é uma das principais direções da ciência de microbiomas, pois permite conectar potencial genético, expressão e produto funcional.

Revisões contemporâneas destacam que diferentes tipos de dados de microbioma — amplicons, shotgun, metatranscriptômica, metabolômica e metaproteômica — possuem estruturas e metadados distintos, e que a ausência de padronização pode dificultar integração, reuso e aplicação de métodos computacionais avançados (Pesole *et al.*, 2024).

SEQUENCIAMENTO DE LEITURAS LONGAS E GENOMAS RECONSTRUÍDOS

O aumento da acurácia de tecnologias de leitura longa, especialmente PacBio HiFi e Oxford Nanopore, abriu novas possibilidades para estudos de microbiomas. Leituras longas podem atravessar regiões repetitivas, melhorar montagens, aumentar a resolução taxonômica e facilitar a associação entre genes e seus contextos genômicos. Revisão publicada na Nature Methods destaca que essas tecnologias têm ampliado a caracterização em nível de linhagem, a recuperação de MAGs mais completos e a análise de variantes em metagenomas (Agustinho *et al.*, 2024).

No sequenciamento de amplicons, leituras longas permitem cobrir o gene 16S quase completo, potencialmente melhorando a resolução em comparação com regiões curtas. Na metagenômica shotgun, pode reduzir a fragmentação de montagens e facilitar a ligação de genes de resistência, elementos móveis ou vias metabólicas aos respectivos hospedeiros. Estudos comparativos recentes mostram, contudo, que métodos de amplicon de leitura curta, 16S completo por Nanopore e shotgun de leitura longa podem convergir para táxons dominantes, mas divergir em estimativas de diversidade, táxons raros e abundâncias relativas (Albastaki *et al.*, 2026).

Portanto, leituras longas não eliminam vieses metodológicos. Qualidade do DNA, profundidade de sequenciamento, composição da comunidade, algoritmos de correção, montagem e bancos de referência continuam determinantes. Em muitos projetos, estratégias híbridas combinando leituras curtas de alta acurácia e leituras longas podem oferecer equilíbrio entre profundidade, precisão e continuidade genômica.

BIOINFORMÁTICA E ESTATÍSTICA COMO PARTE DO MÉTODO

A evolução da microbiologia molecular tornou a bioinformática uma etapa constitutiva do experimento. Controle de qualidade, remoção de adaptadores e primers, detecção de quimeras, denoising, montagem, binning, anotação e

classificação taxonômica podem alterar substancialmente o resultado. Assim, versão do software, parâmetros, bancos de referência e critérios de filtragem devem ser relatados com o mesmo rigor aplicado a reagentes e equipamentos.

Dados de microbioma são tipicamente esparsos, de alta dimensionalidade e composicionais. A soma das abundâncias relativas é restrita, de modo que o aumento aparente de um táxon pode refletir redução de outro. Por isso, testes estatísticos concebidos para dados independentes e não composicionais podem produzir interpretações inadequadas. O desenho experimental, número de réplicas, estrutura de grupos, covariáveis ambientais e controle de múltiplas comparações são componentes essenciais.

Em análises de diversidade, métricas alfa descrevem aspectos da diversidade dentro de amostras, enquanto métricas beta quantificam diferenças entre comunidades. A escolha entre medidas baseadas em abundância, presença/ausência ou filogenia deve estar alinhada à hipótese. Da mesma forma, análises de abundância diferencial, redes microbianas e modelos preditivos requerem métodos compatíveis com a estrutura dos dados.

O uso de aprendizado de máquina e modelos de linguagem em microbiomas cresce rapidamente, com aplicações em classificação de amostras, predição funcional e representação de sequências. Contudo, conjuntos de treinamento, metadados incompletos, efeitos de lote e validação externa permanecem desafios. A sofisticação computacional não compensa um desenho amostral inadequado.

INTEGRAÇÃO ENTRE DADOS TAXONÔMICOS, FUNCIONAIS E AMBIENTAIS

Em microbiologia ambiental, a composição microbiana deve ser interpretada em conjunto com o contexto físico-químico. pH, salinidade, granulometria, matéria orgânica, nutrientes, oxigênio, potencial redox, metais e contaminantes podem atuar como filtros ecológicos e explicar parte da variação observada entre comunidades. A integração entre matrizes ambientais e microbiológicas permite testar relações entre estrutura comunitária e gradientes ambientais.

A escolha da abordagem deve considerar a escala da pergunta. Para triagem de grande número de amostras e comparação de comunidades, amplicons podem oferecer excelente relação custo-informação. Para investigar genes e vias diretamente, shotgun é mais apropriado. Para avaliar atividade, metatranscriptômica, metaproteômica ou metabolômica é mais informativa. Para demonstrar capacidade metabólica de um organismo específico ou desenvolver aplicação biotecnológica, o isolamento e a experimentação continuam fundamentais.

Dessa forma, a metodologia ideal é frequentemente combinatória. Um estudo pode usar amplicons para identificar padrões espaciais, shotgun em subconjunto representativo para caracterização funcional, qPCR para quantificar genes-alvo e cultivo para validar fenótipos. Essa estratégia reduz a dependência de uma única fonte de evidência.

PRINCIPAIS LIMITAÇÕES E FONTES DE VIÉS

Nenhuma técnica produz uma representação neutra do microbioma. Na etapa pré-analítica, coleta, preservação, transporte, armazenamento e extração de DNA ou RNA podem favorecer ou perder grupos específicos. Diferentes protocolos de lise apresentam eficiências distintas para células Gram-positivas, esporos, arqueias, fungos e organismos associados a partículas.

Em abordagens de amplicon, seleção de primers, número de ciclos de PCR, formação de quimeras, número de cópias do marcador e região escolhida afetam a composição observada. Em shotgun, DNA do hospedeiro, profundidade insuficiente e complexidade da comunidade podem limitar a recuperação de genomas e genes raros. Em leituras longas, integridade e quantidade de DNA de alto peso molecular tornam-se particularmente importantes.

A etapa computacional adiciona outra camada de variabilidade. Bancos taxonômicos diferem em cobertura e nomenclatura; algoritmos podem produzir classificações distintas; limiares de filtragem modificam a retenção de táxons raros. Consequentemente, comparações entre estudos devem considerar diferenças metodológicas antes de atribuir discrepâncias exclusivamente à ecologia.

Boas práticas incluem controles negativos de extração e PCR, comunidades mock quando possível, randomização de lotes, metadados completos, disponibilização de sequências brutas, registro de versões de software e compartilhamento de scripts. A reprodutibilidade depende tanto da transparência analítica quanto da qualidade experimental.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A tendência é aumentar simultaneamente resolução, integração e capacidade de interpretação. Sequenciamento de leitura longa já melhora a recuperação de genomas completos ou quase completos e a associação entre genes e hospedeiros. A redução de custos pode tornar abordagens de alta resolução acessíveis a séries ambientais maiores.

Outra fronteira é a integração multiômica. Combinar DNA, RNA, proteínas e metabólitos pode aproximar a descrição da comunidade de uma compreensão mecanística de processos ecológicos. O desafio será desenvolver modelos capazes de integrar escalas e tipos de dados sem perder rastreabilidade e interpretabilidade.

Métodos de célula única, espacialização de comunidades, metagenômica temporal e experimentos de manipulação devem complementar levantamentos observacionais. Paralelamente, inteligência artificial e modelos treinados em grandes coleções de sequências podem auxiliar na anotação de proteínas, identificação de famílias gênicas e geração de hipóteses. Entretanto, a validação experimental continuará necessária, sobretudo quando o objetivo for atribuir função ecológica ou potencial biotecnológico.

Finalmente, a expansão de bancos de dados de ecossistemas tropicais, costeiros e outros ambientes historicamente subamostrados será crucial. A qualidade das inferências depende da representatividade das referências disponíveis. Ampliar a diversidade geográfica e ecológica dos genomas de referência é, portanto, parte do avanço metodológico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A história das metodologias de avaliação da diversidade microbiana demonstra uma mudança progressiva de observações dependentes de cultivo para abordagens capazes de caracterizar comunidades diretamente em seu ambiente. Métodos clássicos forneceram as bases experimentais da microbiologia, enquanto FISH, PCR, impressões digitais moleculares e sequenciamento de genes marcadores ampliaram o acesso à fração não cultivada. O sequenciamento de alta capacidade e a bioinformática transformaram essa descrição em análises de alta resolução e grande escala.

Metagenômica e outras abordagens ômicas expandiram o foco da taxonomia para o potencial funcional e a atividade. Leituras longas e MAGs aumentam a resolução genômica, enquanto a integração multiômica procura conectar composição, expressão e função. Ainda assim, nenhuma dessas estratégias elimina completamente vieses de amostragem, extração, amplificação, sequenciamento ou análise.

A principal conclusão permanece conceitualmente consistente com a formulação original deste trabalho: a técnica deve ser escolhida em função da pergunta científica. A abordagem mais sofisticada não é necessariamente a mais adequada. Estudos robustos combinam desenho experimental, controles, métodos complementares e análise transparente. O futuro da microbiologia de comunidades está menos na substituição de técnicas anteriores e mais na integração crítica entre cultivo, métodos moleculares, sequenciamento e ferramentas computacionais.

Quadro 1 - Comparação das principais abordagens para estudo da diversidade microbiana.

Abordagem	Informação principal	Vantagem	Limitação central
Cultivo	Fenótipo e função de organismos recuperáveis	Validação experimental e obtenção de isolados	Viés de cultivabilidade
FISH	Deteção e localização de alvos	Preserva informação espacial	Requer alvo/sonda previamente definidos
DGGE/T-RFLP	Fingerprint de comunidades	Comparação rápida entre amostras	Baixa resolução e identificação limitada
qPCR	Quantificação de genes-alvo	Alta sensibilidade	Análise direcionada a alvos conhecidos

Abordagem	Informação principal	Vantagem	Limitação central
16S/ITS por NGS	Composição taxonômica	Custo relativamente baixo e alto throughput	Viés de PCR e função apenas inferida
Shotgun metagenômica	Taxonomia e potencial funcional	Acesso direto a genes e MAGs	Maior custo e demanda computacional
Metatranscriptômica	Genes expressos	Aproxima-se da atividade	RNA instável e interpretação complexa
Metaproteômica/metabolômica	Proteínas e metabólitos	Informação próxima ao fenótipo	Identificação e atribuição difíceis
Leituras longas	Amplicons completos e contexto genômico	Maior continuidade e resolução	Exige DNA de qualidade e pipelines específicos

Fonte: elaboração própria (2026).

REFERÊNCIAS

AGUSTINHO, D. P. *et al.* Unveiling microbial diversity: harnessing long-read sequencing technology. **Nature Methods**, v. 21, p. 954-966, 2024. DOI: 10.1038/s41592-024-02262-1.

ALBASTAKI, A. *et al.* Choosing Between Short-Read 16S, Full-Length ONT 16S, and Long-Read Shotgun Metagenomics for Soil Microbiome Studies: **A Critical Review of the Benchmarking Evidence**. *Microorganisms*, 2026. PMID: 42197517.

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

BOLYEN, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 852-857, 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.

CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, p. 581-583, 2016. DOI: 10.1038/nmeth.3869.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, p. 2639-2643, 2017. DOI: 10.1038/ismej.2017.119.

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

DOUGLAS, G. M. *et al.* PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 685-688, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0548-6.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities based on patterns of community-level sole-carbon-source

utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2351-2359, 1991.

IBEKWE, A. M.; KENNEDY, A. C. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. **Plant and Soil**, v. 206, p. 151-161, 1999.

KIM, C.; PONGPANICH, M.; PORNTAVEETUS, T. Unraveling metagenomics through long-read sequencing: a comprehensive review. **Journal of Translational Medicine**, v. 22, art. 111, 2024. DOI: 10.1186/s12967-024-04917-1.

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.

OSBORN, A. M.; MOORE, E. R. B.; TIMMIS, K. N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2000.

PINTO, Y.; BHATT, A. S. Sequencing-based analysis of microbiomes. **Nature Reviews Genetics**, v. 25, p. 829-845, 2024. DOI: 10.1038/s41576-024-00746-6.

PESOLE, G. *et al.* A comprehensive overview of microbiome data in the light of machine learning applications: categorization, accessibility, and future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 1343572, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1343572.

PYLRO, V. S. *et al.* Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity - challenges and prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 237-241, 2014.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

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

ZAK, J. C. *et al.* Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 9, p. 1101-1108, 1994.

NOTA SOBRE A ORIGEM DO TEXTO

Este capítulo constitui versão substancialmente revisada, condensada e atualizada do trabalho de conclusão de curso apresentado em 2018 à Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, com incorporação de literatura e abordagens metodológicas posteriores.