

BIOPROSPECÇÃO DE NOVOS GENES PARA A INDÚSTRIA USANDO METAGENOMA E BIOINFORMÁTICA

ALEXANDER MACHADO CARDOSO^{1*}

¹Diretoria de Programa, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO, Rio de Janeiro, 25250020, Brasil.

ABSTRACT

There is a growing demand for new enzymes that enable cost reduction and efficiency improvement in industrial processes without harming the environment. Using classical methods of microbiology and biochemistry we can obtain less than 1% of the information contained in an environment. This is because the vast majority of microorganisms are not cultivable. Thanks to the advancement of metagenome and bioinformatics techniques, new possibilities for the industry are revealed. Here, the bioprospecting of the invasive snail microbiota for use in the biofuel industry is discussed.

Keywords: biofuel, biodiversity, snail, metagenome.

INTRODUÇÃO

A bioprospecção pode ser definida pela busca na natureza de recursos genéticos e bioquímicos para a obtenção de novos produtos ou processos com fins comerciais. O homem sempre buscou novos medicamentos, alimentos e inspiração para a resolução de seus problemas com a observação e exploração dos ecossistemas naturais. Contudo, até recentemente o estudo dos micro-organismos ambientais estava limitado a uma pequena parcela (Rondon et al., 2000). Sabe-se atualmente que a grande maioria dos micro-organismos não é capaz de ser cultivado e com isso estudado e explorado com os métodos clássicos (Whitman et al., 1998), seja porque não conseguem sobreviver sem a presença de um outro organismo ou simplesmente porque ainda não se desenvolveram métodos e meios de cultivo apropriados para determinada espécie.

Vale ressaltar que existem mais micro-organismos nos nossos mares do que estrelas no universo (Whitman et al., 1998; Gilbert, 2010). No corpo humano, temos pelos menos dez vezes mais micro-organismos do que nossas próprias células e cerca de cem vezes mais material genético microbiano do que o nosso (Berg, 1996; Qin et al., 2010). Na verdade, o mundo microbiano e suas potencialidades começaram a ser reveladas graças aos recentes avanços nas tecnologias de sequenciamento do DNA em larga escala e o desenvolvimento de ferramentas e métodos computacionais para processá-las.

A metagenoma consiste em estudar todo o material genético contido em um determinado ambiente. Para tanto após a coleta, o DNA total é extraído e sua informação biológica é revelada por sequenciamento e técnicas computacionais (Wooley et al., 2010), desse modo não há mais a necessidade de se isolar e culti-

var os micro-organismos. Temos agora a capacidade de obter sua informação genética diretamente das comunidades microbianas em seus habitats naturais. Em vez de olhar para algumas espécies individualmente, somos agora capazes de estudar dezenas de milhares de genes, tudo ao mesmo tempo. Os dados das sequências tomadas diretamente a partir do ambiente constituem o que se denomina metagenoma, ou seja, o conjunto de genomas de um determinado ambiente (Handelsman et al., 1998).

O estudo da biodiversidade genética microbiana tem proporcionado novos conhecimentos sobre a composição das comunidades, suas interações e funções ecológicas, informações fundamentais para a compreensão do funcionamento dos mais variados ecossistemas (Cardoso et al. 2011). Bem como, tem proporcionado a descoberta e prospecção de novos genes para a pesquisa aplicada (Cardoso et al., 2010). Apesar da importância natural, social e econômica, são ainda poucos os estudos disponíveis da microbiota associada a plantas, água, solos, insetos e outros animais presentes no estado do Rio de Janeiro, especialmente no que tange a microbiota associada a gastrópodes terrestres (Cardoso et al. 2012).

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O etanol, também conhecido como álcool etílico, é uma substância obtida da fermentação de carboidratos. No Brasil o etanol é muito utilizado como combustível de motores de explosão, constituindo um mercado em ascensão. O mundo cada vez mais abre espaço para o comércio internacional de um combustível obtido de maneira renovável (Goldemberg, 2007). O bioetanol é o gênero que compreende todos os processos de obtenção de etanol cuja matéria-prima empregada seja a biomassa, como exemplo, a cana de açúcar (sacarose) e o milho (amido) pertencem à primeira geração de bioetanol e a celulose e hemicelulose (lignocelulose) das plantas podem incrementar a segunda geração desse biocombustível (Goldemberg, 2008; Somerville et al., 2010).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com uma safra estimada em 338 milhões de toneladas (27% da produção mundial). A cultura de cana brasileira representa cerca de 25% (cinco milhões de hectares) da área canavieira mundial, emprega cinco milhões de trabalhadores direta e indiretamente e é a base do programa bioenergético Pro-álcool. A cada safra, o Brasil produz cerca de 350 milhões de toneladas de cana-de-açúcar que são convertidas em 14,5 milhões de toneladas de açúcar e 15,3 bilhões de litros de álcool, o que leva o país a economizar na importação de aproximadamente 260.000 barris de petróleo por dia (Goldemberg, 2007; Goldemberg, 2008).

Além disso, o uso de álcool como combustível contribui significativamente para a diminuição da poluição e aquecimento global emitindo 13% menos NO_x, 57% menos CO e 64% menos hidrocarbonetos do que o uso de combustíveis fósseis. Qualquer biocombustível, além de ter que ser economicamente viável e ecologicamente limpo (com menor impacto ambiental) necessita também de tecnologias que garantam a sua produção com balanços energéticos altamente positivos (Somerville et al., 2010).

No caso da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, o Brasil é o país mais competitivo do planeta. Contudo, os governos europeus e norte-americano têm investido bilhões de dólares em subsídios e em tecnologia para dominar a produção de etanol.

Os preços oscilantes do petróleo e questões ambientais criam oportunidades para o aumento da produção de álcool. Torna-se, portanto essencial o entendimento e desenvolvimento de técnicas e processos biotecnológicos mais eficientes para suprir o aumento desta demanda (Ragauskas et al., 2006; Rubin, 2008).

Recentemente, tem sido proposta a utilização de rejeitos da agricultura, como bagaço de cana-de-açúcar, em especial o uso da celulose (o componente mais abundante da parede celular das plantas) para a produção de etanol, o chamado celunol (Rubin, 2008). Vários pesquisadores previamente tentaram o desenvolvimento de um processo eficiente e barato para

para a produção de etanol a partir de celulose da biomassa vegetal usando bactérias e leveduras recombinantes (Ingram et al., 1998; Aristidou & Penttilä, 2000), mas até o momento economicamente sem sucesso. Assim, torna-se fundamental na biotecnologia moderna dos biocombustíveis a busca de novos micro-organismos e enzimas que possam desenvolver, mas efetiva e eficientemente, os processos de conversão de materiais lignocelulósicos em carboidratos fermentáveis. O domínio do processo deste tipo é necessário não somente para liderança no setor de bioenergia como também necessário para resolução de problemas ambientais tais como aquecimento global e a construção de uma sociedade independente de combustíveis fósseis.

OS CARAMUJOS

O gastrópode terrestre *Achatina fulica* é originário da África e foi introduzido no Brasil (Paraná) por volta de 1988, por criadores de escargot europeu (*Helix aspersa*). Estes criadores acreditaram que a introdução desta espécie de caramujo seria uma alternativa viável economicamente, pois são animais que se reproduzem intensamente, com rápido crescimento e fornecem mais carne do que os caramujos *Helix aspersa*. No entanto, os consumidores não apreciaram o sabor, textura e o aspecto da carne deste novo caramujo. O que seria uma alternativa viável tornou-se impraticável devido à rejeição do mercado a *Achatina fulica* (Thiengo et al., 2007). No entanto, os animais mantiveram seu processo reprodutivo, proliferando de forma desordenada até que os proprietários, de forma catastrófica para o meio ambiente, jogaram estes animais na natureza. Devido à alta adaptabilidade da espécie, não encontraram dificuldades para crescer e multiplicar-se intensamente em todo território brasileiro (Albuquerque et al., 2008).

Assim, muito abundante no nosso país, e de fácil criação e manutenção em cativeiro, a *A. fulica* pode alcançar 200 g quando adulto. Caracteriza-se por ser uma espécie rústica que possui carne mais escura do que a espécie européia e melhor adaptação ao clima tropical brasileiro,

além de possuir alta produtividade, podendo ter seis posturas ao ano, com uma média de 300 ovos a cada postura (Thiengo et al., 2007).

Poucas celulasas têm sido isoladas de moluscos. Entre estas incluem endoglucanases de *Helix pomatia* (Marshall & Grand, 1976) e *Dolabella auricularia* (Anzai et al., 1988). Muito pouco tem sido feito em relação a celulasas de *A. fulica* (Maeda et al., 1996; Teng et al., 2010). Ainda não se conhece se as atividades enzimáticas lignocelulolíticas previamente identificadas no seu suco digestivo, são provenientes do próprio caramujo ou de sua microbiota residente.

O suco digestivo, produzido pela glândula digestiva, é encontrado em grande quantidade (cerca de 5% do peso total do animal) preenchendo uma parte significativa do tubo gastrointestinal. A concentração de proteína no suco digestivo é de aproximadamente 200 mg/ml (Maeda et al., 1996). Embora as enzimas encontradas no suco digestivo de gastrópodes terrestres sejam pouco estudadas, algumas atividades estão bem identificadas. Encontramos entre outras, lipopolissacaridase, α -glicuronidase, muramidase, xilanase, pectinase, amilase, celobiase, sacarase, quitinase e celulase. A atividade celulásica é significativa mesmo quando se usa celulose cristalina como substrato (Cardoso et al. Dados não publicados). Resultados preliminares mostram que o suco digestivo apresenta uma atividade celulásica em torno de 2 mg de glicose por minuto por ml de suco digestivo, usando como substrato celulose cristalina comercial. O que significa uma disponibilidade teórica de glicose para utilização pelo animal de 6 a 8 mg por minuto. Além disso, uma característica importante das enzimas do suco digestivo deste caramujo é a sua grande estabilidade. O número total de micro-organismos no intestino dos invertebrados pode alcançar um título tão alto quanto 1011/ml. Estes micro-organismos desempenham um papel fundamental na digestão do alimento e são de extrema importância ecológica no ciclo global de carbono. Para compreender a complexidade da estrutura e função das enzimas endógenas dos caramujos bem como de sua microbiota será de suma im-

portância reconhecer e quantificar as principais reações metabólicas que se processam no seu aparelho digestivo. Para isso, a metagenoma se torna essencial. Assim, tanto o animal como sua microbiota são importantes fontes de enzimas que necessitam ser mais bem estudados.

O caramujo africano pode ser responsável pela transmissão de verminoses, perturbações gástricas e até meningites, além de causarem grandes prejuízos a lavouras e plantações comerciais por se alimentarem de qualquer tipo de vegetação (Thiengo et al., 2007; Albuquerque et al., 2008).

No Estado do Rio de Janeiro, o número de municípios com registros de ocorrência de *A. fulica* aumentou sete vezes de 2002 a 2006, com presença confirmada em pelo menos 57 dos 92 municípios do estado (Thiengo et al., 2007). Novos registros de *A. fulica* no Estado do Rio de Janeiro revelam a ausência de invasão em apenas nove municípios (Zanol et al., 2010). Além dos ambientes antrópicos (quintais, terrenos baldios e cultivos agrícolas), essa espécie de caramujo ocorre também em áreas de proteção ambiental, como no Parque Municipal Ecológico Grumari, na Reserva Biológica de Poços das Antas (Faraco e Lacerda, 2004) e nos Parques Estaduais do Chacrinha, da Pedra Branca e da Ilha Grande (Santos et al., 2002).

No município do Rio de Janeiro, por exemplo, dos 181 bairros existentes, 155 possuem locais de infestação por essa espécie (Thiengo et al., 2007; Zanol et al., 2010). Além de seu poder destrutivo da flora e fauna locais e de seu potencial em carrear parasitas, pouco se sabe sobre a microbiota associada a esses animais. Recentemente, determinamos e identificamos por métodos moleculares novas espécies de bactérias presentes no trato digestivo deste caramujo (Cardoso et al. 2012) revelando que esta espécie de caramujo atua como um reservatório de novas cepas com interesse na saúde (potencialmente patogênicas), bem como cepas possuidoras de enzimas degradadoras de biomassa vegetal o que explica em parte a alta capacidade digestiva deste animal. A relevância pela busca de novas enzimas e micro-organismos celulolíti-

cos é demonstrada pelo aumento do número de projetos e artigos focando a microbiota do trato digestivo de animais como cupins, bois, cangurus, pandas e ruminantes de uma forma geral (Warnecke et al., 2007; Brulc et al., 2009; Hess et al., 2011; Pope et al., 2010; Zhu et al., 2011). A maioria das bactérias dos caramujos ainda não foi cultivada em laboratório e há necessidade de um estudo mais detalhado destes micro-organismos utilizando-se ferramentas moleculares bem como incrementar o estudo de suas enzimas. Assim a eficiência dos caramujos e sua microbiota associada em degradar compostos lignocelulolíticos pode servir como fonte de enzimas para utilização em vários processos biotecnológicos, tais como o uso das glicosil hidrolases (GHs) na produção de biocombustíveis. A celulose é a biomassa mais abundante do planeta (Tomme et al., 1995). Ela é uma forma polimerizada de moléculas de glicose com ligações β -1,4 consistindo de formas compostas de microfibrilas cristalizadas entre matrizes amorfas, que dificulta o acesso de enzimas hidrolisantes. Três maiores passos no processo de conversão dos carboidratos em etanol são conhecidos: pré-tratamento termoquímico para aumentar os acessos das enzimas à celulose; sacarificação enzimática, com o uso de celulasas e em algumas ocasiões de hemicelulasas e o processo fermentativo dos açúcares liberados por micro-organismos especializados (Ragauskas et al., 2006). Assim, torna-se fundamental na biotecnologia moderna dos biocombustíveis a busca de novos micro-organismos e enzimas que possam aprimorar este processo (Rubin, 2008). As celulasas são grupos de enzimas hidrolíticas que possuem a habilidade de hidrolisar celulose insolúvel em seu monômero – glicose. As celulasas compreendem três tipos de enzimas: endoglucanases, as quais clivam ligações glicosídicas internas β -1,4, exoglucanases, também conhecida como celobiohidrolases, que agem nas cadeias de celulose liberando cadeias menores celooligosacarídeos e β -glucosidases, as quais hidrolisam os celooligosacarídeos solúveis liberando glicose. Micro-organismos celulolíticos desenvolveram formas complexas de sistemas

celulolíticos, os quais hidrolisam ativamente as fibrilas de celulose (Thomme et al., 1995).

Torna-se assim importante, continuar a busca de novas enzimas e micro-organismos que possam incrementar a produção de bioetanol a partir de estruturas complexas e desenvolver, a baixo custo e com maior eficiência hidrolítica, celulasas e hemicelulasas comerciais para trabalhar sinergicamente na produção deste biocombustível, degradando polissacarídeos complexos, como os do bagaço da cana-de-açúcar e resíduos da agricultura em monossacarídeos fermentáveis.

Da moagem de uma tonelada de cana, uma usina produz, em média, 153 quilos de melaço (açúcar e etanol), 165 quilos de palha e 276 quilos de bagaço residual. A conversão industrial da biomassa lignocelulósica em etanol de modo a alcançar rendimentos que a tornem competitiva em relação aos combustíveis fósseis necessita de enzimas estáveis e ativas em condições de alta temperatura e/ou de pH baixo e com alta eficiência catalítica (Somerville et al., 2010). A metagenoma e a utilização de ferramentas computacionais para lidar com a enxurrada de informações e sequências se tornam cada vez mais necessárias.

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA DIVERSIDADE MICROBIANA

Além da grande experiência na produção do etanol, outro diferencial competitivo do Brasil para o desenvolvimento e liderança neste setor é sua notável biodiversidade, infelizmente ainda pouco explorada (Cardoso et al., 2003; Alquéres et al., 2007; Cardoso et al., 2011).

São cerca de 200 mil espécies de plantas, animais e micro-organismos já registrados e estima-se que este número possa chegar a mais de um milhão de espécies. É praticamente um quinto de toda a biodiversidade mundial distribuída em seis biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa), além da Zona Costeira e Marinha (Cardoso et al., 2003).

Indubitavelmente a Mata Atlântica é um

dos biomas com mais alta biodiversidade no nosso planeta. Além disto, altíssimo endemismo de espécies de animais e plantas salienta ainda mais a sua importância, mas, paradoxalmente, é também neste bioma que se observa uma das mais altas taxas de perda de biodiversidade. Hoje menos de 10% da cobertura original de mata ainda é preservada. Até o presente, já foram documentadas mais de 30 mil espécies de plantas e animais, muitos dos quais estão ameaçados de extinção. Por outro lado, não se tem idéia sobre os tipos microbianos presentes na Mata Atlântica e em associação com animais e plantas.

Um estudo recente publicado no periódico Science com base em bibliotecas de rDNA 16S sugeriu que existiriam pelo menos 10 milhões de novas espécies de bactérias associadas com plantas da Mata Atlântica (Lambais et al., 2006), enquanto que dados globais da literatura indicam que cada grama de solo teria milhares de espécies de procariontes pertencentes, especialmente, aos grupos das Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, e Firmicutes (Schloss & Handelsman, 2006).

Claramente existem amplas oportunidades de estudos da biodiversidade microbiana. Estes estudos terão, provavelmente, forte impacto na microbiologia no âmbito internacional. Considerada a diversidade genética e bioquímica presente neste patrimônio natural, depara-se com um universo de oportunidades para a inovação biotecnológica. Diante deste quadro, as perspectivas atuais são muito positivas para que a biotecnologia no Brasil seja portadora de um futuro promissor e revolucionário para a economia e a sociedade brasileira no cenário econômico interno e mundial.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O benefício técnico principal é que estas novas metodologias de estudo dos micro-organismos (metagenoma e bioinformática) se inserem em um contexto nacional e internacional mais amplo do dinamismo do sistema de biotecnologia, inovação e produção, que constitui uma das bases da competitividade e

do desenvolvimento do país, e que depende, de um lado, do potencial de geração de conhecimento científico e tecnológico na área e, de outro lado, da capacidade do setor produtivo em absorver este conhecimento e transformá-lo em produtos e processos comercializados.

No Brasil, o surgimento e a consolidação das iniciativas voltadas para o desenvolvimento da biotecnologia e inovação em setores sensíveis como o de biocombustível, por exemplo, constituem fatores críticos para a competitividade da indústria nacional. Foi com esta preocupação que o governo brasileiro deu uma clara orientação estratégica de apoio à área e também criou por lei o Comitê Nacional de Biotecnologia. Neste cenário, aparece como fator fundamental à existência de uma infra-estrutura científica e tecnológica capaz de dar o suporte necessário para área, envolvendo a realização de pesquisa, tecnologia, produção e qualidade requeridas para o desenvolvimento de projetos na área de metagenoma.

AGRADECIMENTOS

Os projetos citados neste artigo foram em grande parte financiados pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

ALQUERES SMC, ALMEIDA, RV, CLEMENTINO MM, VIEIRA RP, ALMEIDA WI, CARDOSO AM, MARTINS OB. 2007. Exploring the Biotechnological Applications of Archaea Domain. *Braz J Microbiol* 38:398–405.

ALBUQUERQUE FS, PESO-AGUIAR MC & ASSUNÇÃO-ALBUQUERQUE MJT. 2008. Distribution, feeding behavior and control strategies of the exotic land snail *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) in the northeast of Brazil. *Braz J Biol* 68:837–842.

ANZAI H, UCHIDA N, NISHIDE E, NISIZAWA K & MATSUDA K. 1988. Isolation of a complex of endo-cellulases from the gastric teeth of *Dolabella auricularia* by affinity chromatography. *Agric Biol Chem* 52:633–640.

ARISTIDOUA & PENTTILAM. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr Opin Biotechnol* 11:187–198.

BERG R. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4: 430–435.

BRULC JM, et al. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:1948–1953.

CARDOSO AM, et al. 2012. Gut Bacterial Communities in the Giant Land Snail *Achatina fulica* and Their Modification by Sugarcane-Based Diet. *PLoS ONE*. 7: e33440.

CARDOSO AM, CLEMENTINO MM, VIEIRA RP, CAVALCANTE JJV, ALBANO RM & MARTINS OB. 2010. Archaeal Metagenomics: Bioprospecting Novel Genes and Exploring New Concepts. In: MARCO, D. (Org.). *Metagenomics: Theory, Methods, and Applications*. Metagenomics: Theory, Methods, and Applications. Wymondham: Caister Academic Press, v. 1, p. 159–169.

CARDOSO AM, VIEIRA RP, PARANHOS R, CLEMENTINO MM, ALBANO RM & MARTINS OB. 2011. Hunting for Extremophiles in Rio de Janeiro. *Front. Microbiol*. 2:100–103.

FARACO FA & LACERDA ACR. 2004. Contaminação biológica em unidades de conservação – o caso do caramujo africano (*Achatina fulica*, Mollusca, Gastropoda). In Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Rede Nacional Pró Unidades de Conservação, Curitiba, p. 78–84.

GILBERT JA. 2010. Beyond the In-

- finite - tracking bacterial gene expression. *Microbiol Today* 37:82-85.
- GOLDEMBERG J. 2007. Ethanol for a sustainable energy future. *Science* 315:808-810.
- GOLDEMBERG J. 2008. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol Biofuels* 1:6-13.
- HANDELSMAN J, RONDON MR, BRADY SF, CLARDY J & GOODMAN RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5:245-249.
- HESS M, et al. 2011. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*. 331:463-467.
- INGRAM LO, GOMEZ PF, LAI X, MONIRUZZAMAN M, WOOD BE, YOMANO LP & YORK SW. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol Bioeng* 58:204-214.
- LAMBAIS MR, CROWLEY DE, CURY JC, BULL RC & RODRIGUES RR. 2006. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. *Science* 312:1917.
- MAEDA I, SHIMOHIGASHI Y, KIHARA H & OHNO M. 1996. Purification and characterization of a cellulase from the giant snail *Achatina fulica*. *Biosci Biotech Biochem* 60:122-124.
- MARSHALL JJ, GRAND RJ. 1976. Characterization of a beta-1,4-glucan hydrolase from the snail, *Helix pomatia*. *Comp Biochem Physiol B* 53:231-237.
- POPE PB, et al. 2010. Adaptation to herbivory by the Tammar wallaby includes bacterial and glycoside hydrolase profiles different from other herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:14793-14798.
- QIN J, et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59-65.
- RAGAUSKAS AJ, et al. 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* 311:484-489.
- RONDON MR, et al. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 66:2541-2547.
- RUBIN EM. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454:841-845.
- SANTOS SB, MONTEIRO DP & THIENGO SC. 2002. *Achatina fulica* (Mollusca, Achatinidae) na Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro: implicações para a saúde ambiental. *Bioc.* 10:159-162.
- SCHLOSS PD & HANDELSMAN J. 2006. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol*. 2(7):e92.
- SOMERVILLE C, et al. 2010. Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. *Science* 329:790-792.
- TENG Y, YIN Q, DING M & ZHAO F. 2010. Purification and characterization of a novel endo-beta-1,4-glucanase, AfEG22, from the giant snail, *Achatina fulica* frus-sac. *Acta Bioch Bioph Sin* 42:729-734.
- THIENGO SC, FARACO FA, SALGADO NC, COWIE RH & FERNANDEZ MA. 2007. Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. *Biol. Invasions*. 9:693-702.
- TOMME P, WARREN RA & GILKES NR. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol* 37:1-81.
- WARNECKE F, et al. 2007. Metagenomic and functional analysis of hind-gut microbiota of a wood-feeding

higher termite. *Nature* 450:560-565.

WHITMAN WB, COLEMAN DC & WIEBE WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6578–6583.

ZANOL J, FERNANDEZ MA, OLIVEIRA, APM & THIENGO SC. 2010. The exotic invasive snail *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) in the State of Rio de Janeiro (Brazil): current status. *Biota Neotrop* 10:1-6.

ZHU L, WU Q, DAI J, ZHANG S & WEI F. 2011. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:17714-17719.