

**Isolamento e amplificação de DNA de Amostras de Solo como Ferramenta para Avaliar a Diversidade das Populações de Bactérias em Solos Agrícolas.**



**República Federativa do Brasil**

*Fernando Henrique Cardoso*  
Presidente

**Ministério da Agricultura e do Abastecimento**

*Marcus Vinícius Pratini de Moraes*  
Ministro

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa***

**Conselho de Administração**

*Márcio Fontes de Almeida*  
Presidente

*Alberto Duque Portugal*  
Vice-Presidente

*Dietrich Gerhard Quast*

*José Honório Accarini*

*Sérgio Fausto*

*Urbano Campos Ribeiral*

Membros

**Diretoria Executiva da Embrapa**

*Alberto Duque Portugal*  
Diretor Presidente

*Bonifácio Hideyuki Nakasu*

*Dante Daniel Giacomelli Scolari*

*José Roberto Rodrigues Peres*

Diretores Executivos

**Embrapa Agrobiologia**

*Maria Cristina Prata Neves*  
Chefe Geral

*José Ivo Baldani*

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Valéria Luiza Pereira Magalhães da Silva*

Chefe Adjunto Administrativo

YEATES, C.; GILLINGS, M. R.; DAVISON, A. D. ALTAVILLA, N.; VEAL, D. A. PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, England, v. 25, n. 4, p. 303-307, oct. 1997.

YOUNG, C. C.; BURGHOFF, R. L.; KEIM, L. G.; MINAK-BERNERO, V.; LUTE, J. R.; HINTON, S. Polyvinylpyrrolidone-Agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 59, n. 6, p. 1972-1974, jun. 1993.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 62, n. 2, p. 316-322, feb. 1996.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ISSN 1517-8498

Junho/2002

## Documentos 148

### Isolamento e amplificação de DNA de Amostras de Solo como Ferramenta para Avaliar a Diversidade das Populações de Bactérias em Solos Agrícolas

Samuel Tavares dos Santos  
Ida Carolina Neves Direito  
Kátia Regina dos Santos Teixeira

Seropédica – RJ

2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR465 – km 47

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: José Ivo Baldani (Presidente)  
José Antônio Ramos Pereira  
Marcelo Grandi Teixeira  
Robert Michael Boddey  
Segundo Sacramento Urquiaga Caballero  
Verônica Massena Reis  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Norma Gouvea Rumjanek

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2002): 50 exemplares

SANTOS, S. T. dos; DIREITO, I. C. N.; TEIXEIRA, K. R. dos S. **Isolamento e amplificação de DNA de amostras de solo como ferramenta para avaliar a diversidade das populações de bactérias em solos Agrícolas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, jun. 2002. 36p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 148).

ISSN 1517-8498

1. Solo. 2. Bactéria 3. DNA. I. Direito, I. C. N., colab. II. Teixeira, K. R. dos S., colab. III. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 631.4

© Embrapa 2002

VALADARES-INGLIS, M. C.; MELO, I. S. Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. (Ed). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 187-204.

VAN ELSAS, J. D.; MÄNTYNER, V.; WOLTERS, A. C. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16s ribosomal RNA sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, Germany, v. 24, n. 2, p. 188 – 195, apr. 1997.

VAN ELSAS, J. D.; SMALLA, K. Extraction of microbial community DNA from soils. In: AKKERMANS, A. D. L; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. (Ed.) **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1995.p. 1.3.3.

VAN ELSAS, J. D.; DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological methods**, Amsterdam, Netherlands, v. 32, n. 2, p.133-154, apr. 1998.

VOLOSSIOUK, T.; ROBB, E. J.; NAZAR, R. N. Direct DNA extraction for PCR – Mediated Assays of Soil Organisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 61, n.11, p. 3972-3976, nov. 1995.

Von WINTZINGERODE, F., GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR – based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, Netherlands, v. 21, n. 3, p. 213-229, nov. 1997.

WIKSTRÖM, P.; WIKLUND, A.; ANDERSON, A. C.; FORSMAN, M. DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types. **Journal of Biotechnology**, New York, NW, USA, v. 52, n. 2, p. 107-120, dec. 1996.

TEBBE, C. C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 59, n. 8, p. 2657-2665, aug. 1993.

TORSVIK, V.L. Cell extraction method. In: AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. (Ed.) **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1995. p. 1.3.1.

TORSVIK, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, England, v. 12, n. 1, p. 15-21, jan. 1980.

TREVORS, J. T. Nucleic acids in the environment. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 331-336, jun. 1996a.

TREVORS, J. T. DNA in soil: adsorption, genetic transformation, molecular evolution and genetic microchip. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, Netherlands, v.70, n.1, p.1-10, jul. 1996b.

TSAI, Y. L.; OLSON, B. H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 57, n. 4, p. 1070-1074, Apr. 1991.

TSAI, Y. L.; OLSON, B. H. Detection of low number of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 2, p. 754-757, feb. 1992a.

TSAI, Y. L.; OLSON, B. H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 7, p. 2292-2295, jul. 1992b.

VAHJEN, W.; TEBBE, C.C. Enhanced detection of genetically engineered *Corynebacterium glutamicum* pUN1 in directly extracted DNA from soil, using the T4 gene 32 protein in the polymerase chain reaction. **European Journal of Soil Biology**, Paris, France, v. 30, n. 2, p. 93-98, apr./jun. 1994.

## Autores

Samuel Tavares dos Santos  
MSc. pelo Curso de Pós-graduação da Ciência do Solo – UFRRJ.

Ida Carolina Neves Direito  
Estudante de Agronomia da UFRRJ, bolsista PIBIC/CNPq.

Kátia Regina dos Santos Teixeira  
Pesquisadora Embrapa Agrobiologia – Laboratório de Genética e Bioquímica.

ROUX, K. H. Optimization and Troubleshooting in PCR. In: Dieffenbach, C. W.; Dveksler, G. S. (Ed.) **PCR Primer: A Laboratory Manual**. Plainville, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. p. 53-62.

SARKAR, G.; KAPELNER, S.; SOMMER, S. S. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, England, v.18, p. 7465, dec. 1990.

SELBACH, P. A. **Optimization of a DNA extraction procedure for phylogenetic probe analysis of soil microbial communities**. 1998. (PhD dissertation) University of Wisconsin. Madison, USA. .

SELENSKA, S. & KLINGMÜLLER, W. DNA recovery and direct detection of *Tn5* sequences from soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, England, v. 13, n. 1, p. 21-24, jul. 1991.

SMALLA, K.; CRESSWELL, N.; MENDONCA-HAGLER, L. C. WOLTERS, A.; VAN ELSAS, J. D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **Journal of Applied bacteriology**, oxford, England, v. 74, n. 1, p. 78-85, jan. 1993.

STEFFAN, R. J.; ATLAS, R. M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 54, n. 12, p. 2185-2191, dec. 1988.

STEFFAN, R. J.; ATLAS, R. M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, CA, USA, v. 45, p. 137-161, 1991.

STEFFAN, R. J.; GOKSØYER, J.; BEJ, A. K.; ATLAS, R. M. Recovery of DNA from soil and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 54, n. 12, p. 2908-2915, dec. 1988.

STOTZKY, G. Soil as an environment for microbial life. In: Elsas, J.D. van; Trevors, J.T.; Wellington, E.M.H. (Ed.) **Modern Soil Microbiology**. New, York, NW, USA: Marcel Dekker, Inc., 1997. p. 1-20.

ORSINI, M.; ROMANO-SPICA, V. A. microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, England, v. 33, n. 1, p. 17-20, jul. 2001.

PEPPER, I. L. PCR: applications for Plant and soil microbes. In: HURST, J.; KNUDSEN, G. R. (Ed.) **Manual of environmental microbiology**. Washington: American Society for Microbiology (ASM), 1997. p. 437-444.

PILLAI, S. D.; JOSEPHSON, K. L.; BAILEY, R. L.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 57, n. 8, p. 2283-2286, aug. 1991.

PORTEOUS, L. A.; ARMSTRONG, J. L.; SEIDLER, R. J.; WATRUD, L. S. An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. **Current Microbiology**, New York, NW, USA, v. 18, n. 5, p. 301-307, may 1994.

REYSENBACH, A. L., GIVER, L. J., WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 10, p. 3417-3418, oct. 1992.

ROBERT, M.; CHENU, C. Interactions between soil minerals and microorganisms. In: STOTZKY, G.; BOLLAG, J. M. **Soil biochemistry**. New York, NW, USA: Marcel Dekker, Inc., 1992. p. 307-404. (v. 7).

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, Brazil, v. 28, n.3, p. 135-147, jul./sep. 1997.

## Apresentação

O Brasil tem uma das maiores biodiversidades graças aos variados tipos de ecossistemas e pela própria característica de país continental.

Conhecer essa biodiversidade é um desafio que se coloca para toda a sociedade e para os cientistas em particular, pois a riqueza biológica só poderá se traduzir em riqueza econômica para a sociedade se acompanhada de informação. A informação é indispensável também para garantir o uso sustentável da biodiversidade.

A diversidade microbiana não é geralmente vista como um recurso nacional que mereça atenção. Talvez pelas dimensões microscópicas dos representantes desse grande grupo. Entretanto, os microrganismos são capazes de explorar uma vasta gama de fontes de energia, são encontrados no solo, no ar e na água. São componentes importantes de todos os nossos ecossistemas com papel relevante na conservação da qualidade dos ambientes e restauração de ambientes que foram degradados.

A caracterização da diversidade microbiana do solo está entre as prioridades estabelecidas nos programas de pesquisa de inúmeros países e a melhoria da metodologia para caracterização, isolamento e identificação de microrganismos são linhas fundamentais de ação para que seja logrado sucesso no entendimento dos fatores determinantes das alterações populacionais da microbiota do solo.

Esse documento é uma contribuição da Embrapa Agrobiologia no sentido de difundir o uso de técnicas moleculares no estudo da diversidade das populações de bactérias nos solos agrícolas.

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	07
2- REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	08
2.1 - Aspectos Físicos e Químicos do Solo e seu Potencial de Interação com os Ácidos nucléicos.....	10
2.2 - Extração do DNA do solo.....	12
2.2.1 - Métodos indiretos de extração de DNA.....	17
2.2.2 - Métodos diretos de extração de DNA.....	19
3- APLICAÇÃO DA PCR NA MICROBIOLOGIA AMBIENTAL.....	21
3.1 - Fatores que interferem com a aplicação da técnica de PCR em amostras ambientais.....	23
3.2 - Parâmetros da reação que requerem otimização.....	24
3.3 - Variações da técnica de PCR.....	25
4 - Considerações finais sobre a aplicação destas técnicas na Ecologia Microbiana.....	27
5 - REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	28

MILLER, D. N. Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, Netherlands, v. 44, n. 1, p. 49-58, feb. 2001.

MILLER, D. N.; BRYANT, J. E.; MADSEN, E. L.; GHIORSE, W. C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 65, n. 11, p. 4715-4724, nov. 1999.

MORÉ, M. I.; HERRICK, J. B.; SILVA, M. C.; GHIORSE, W. C.; MADSEN, E. L. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 60, n. 5, p. 1572- 1580, may 1994.

MYROLD, D. D.; MARTIN, K. J.; RITCHIE, N. J. Gel purification of soil DNA extracts. In: AKKERMANS A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. (Ed.) **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1995. p.1.3.5.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, Netherlands, v. 7, n. 1, p. 57-66, feb. 1987.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; GUSTIN, D.; LEWIS, R. J. DNA adsorption to soils and sediments. **Environmental Science and Technology**, Washington DC USA, v. 22, n. 8, p. 982-984, Aug, 1988.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, England, v. 32, n. 11/12, p. 1499-1504, oct. 2000.

HERRON, P. R.; WELLINGTON, E. M. H. New method for extraction of streptomycete spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. **Applied and Environmental Microbiology, Washington, DC, USA**, v. 56, n. 5, p. 1406-1412, may 1990.

HOLBEN, W. E.; JANSSON, J. K.; CHELM, B. K.; TIEDJE, J. M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology, Washington, DC, USA**, v. 54, n. 3, p. 703-711, mar. 1988.

KRSEK, M.; WELLINGTON, E. M. H. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. **Journal Of Microbiological Methods**, Amsterdam, Netherlands, v. 39, n. 1, p. 1-16, DEC. 1999.

KUSKE, C. R.; BANTON, K. L.; ADORADA, D. L.; STARK, P. C.; HILL, K. K.; JACKSON, P. J. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. **Applied And Environmental Microbiology, Washington, DC, USA**, v. 64, n.7, p. 2463-2472, JUL. 1998.

LEFF, L. G.; DANA, J. R.; McARTHUR, J. V.; SHIMKETS, L. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. **Applied and Environmental Microbiology, Washington, DC, USA**, v. 61, n. 3, p. 1141-1143, mar. 1995.

LÉVESQUE, M. J.; BOISSIÈRE, S. L.; THOMAS, J. C.; BEAUDET, R.; VILLEMUR, R. Rapid method for detecting *Desulfitobacterium frapperi* strain PCP – 1 in soil by the polymerase chain reaction. **Applied Microbiology and biotechnology**, Germany, v. 47, n. 6, p. 719-725, jun. 1997.

MacDONALD, R. M. Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms from suspension by elutriation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, England, v. 18, n. 4, p. 399-406, jul. 1986.

## Isolamento e amplificação de DNA de Amostras de Solo como Ferramenta para Avaliar a Diversidade das Populações de Bactérias em Solos Agrícolas.

---

Samuel Tavares dos Santos  
Ida Carolina Neves Direito  
Kátia Regina dos Santos Teixeira

### 1. Introdução

---

Até recentemente, o estudo da diversidade dos microrganismos no seu ambiente em geral era feita apenas com base em métodos que dependiam do isolamento e crescimento desses microrganismos em meio de cultura seguido de testes fisiológicos e/ou bioquímicos. Porém, freqüentemente observações ao microscópio têm revelado que a maioria das populações microbianas presentes no ambiente não são amostradas. A principal causa dessa afirmação pode ser derivada de um ou mais fatores. Dentre estes fatores podemos citar: a perda por sedimentação de células associadas às partículas de solo durante as diluições e o plaqueamento; a morte das células durante as diluições ou pelo seu dessecamento na superfície das placas; seu status celular viável mas não culturável (influenciado pelo pH, temperatura, resposta ao estresse nutricional, etc); interdependência entre o microrganismo e um outro organismo; ou, pela dependência de desenvolver meio de cultura capaz de imitar as condições de crescimento encontradas na natureza.

Portanto, o avanço no desenvolvimento de técnicas moleculares e sua aplicação na área de ecologia microbiana têm se revelado essencial para superar limitações das técnicas de contagem e isolamento, garantindo um levantamento mais abrangente das comunidades existentes nas amostras ambientais.

Uma das estratégias mais aplicada na última década para monitorar a presença de microrganismos alvos e/ou avaliar a diversidade e

dinâmica das populações presentes em amostras ambientais se baseia na obtenção de DNA, independente do cultivo dos microrganismos presentes no ambiente, e amplificação de seqüências alvo utilizadas como marcadores (filogenéticos, funcionais e/ou estruturais). Posteriormente essas moléculas amplificadas podem ser utilizadas para gerar perfis eletroforéticos, matrizes para hibridização com sondas de oligonucleotídeos ou construção de bibliotecas para seqüenciamento.

No entanto, dentre os vários protocolos existentes para extração de DNA de amostras ambientais e aplicados em amostras do solo, as características físicas e químicas do solo muitas vezes são ignoradas. Consequentemente, os produtos derivados da extração podem apresentar características intrínsecas desse ambiente, o que dificultaria a aplicação de etapas subsequentes do processo de análise da diversidade de comunidades. Os resultados obtidos no Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia mostram que a aplicação de protocolos para extração de DNA a partir de solo de diferentes tipos, submetidos ou não a manejo agrícola, e para amplificação das amostras de DNA obtidas requerem otimização para adequação do uso destas técnicas no estudo da ecologia microbiana.

## 2. Revisão bibliográfica

---

Vários autores têm chamado a atenção para a dificuldade de se realizar estudos de ecologia microbiana do solo devido as inúmeras limitações apresentadas por esse ambiente (von Wintzingerode et al., 1997; Bull, 2000). Segundo estes autores, ao contrário de ambientes aquáticos - onde a quantidade de partículas inorgânicas ou orgânicas é muito baixa - no solo existe uma infinidade de colóides com cargas elétricas capazes de adsorver as moléculas de DNA. Esta característica do solo tem se mostrado um fator limitante na obtenção de DNA desse ambiente, especialmente para os métodos de extração em que o DNA é liberado durante a etapa de lise celular ainda na presença do solo. Este tipo de interação tem interferido na eficiência de diversos protocolos de extração de DNA quando aplicados em diferentes tipos de solo, sendo necessária a

CAMARGO, F. A. O., SANTOS, G.; GUERRA, J. G. M. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G.; CAMARGO, F.A.O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. Ecosistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, RS: Gênese, 1999, p. 27 – 39.

CLEGG, C. D.; RITZ, K. & GRIFFITHS, B. S. Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, England, v. 25, n. 1, p. 30-33, jul.1997.

CULLEN, D. W.; HIRSCH, P. R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, England, v. 30, n. 8/9, p. 983 – 993, aug. 1998.

CULLEN, D. W.; NICHOLSON, P. S. MENDUM, T. A.; HIRSCH, P. R. Monitoring genetically modified rhizobia in field soil using the polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, England, v. 84, n. 6, p. 1025-1034, jun. 1998.

FAEGRI, A.; TORSVIK, V. L.; GOKSÖYR, J. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, England, v. 9, n. 2, p. 105-112, mar. 1977.

FROSTEGÅRD, Å., COURTOIS, S., RAMISSE, V., CLERC, S., BERNILLON, D., GALL, F. L., JEANNIN, P., NESME, X.; SIMONET, P. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. **Applied and Environmental Microbiology, Washington, DC, USA**, v. 65, n. 12, p. 5409-5420, dec. 1999.

JACOBSEN, C. S.; RAMUNSSON, O. F. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil with cation-exchange resin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 8, p.2458-2462, aug. 1992.

## 5 - Referencia Bibliográfica.

ABU AL-SOUD, W.; RÅDSTROM, P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces and meat. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 38, n. 12, p. 4463 – 4470, dec. 2000.

ALM, E.W.; ZHENG, D.D.; RASKIN, L. The presence of humics substance and DNA in RNA extracts affects hybridization results. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v.66, n. 10, p. 4547-4554, oct. 2000.

BAYER, C.;MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G.;CAMARGO, F.A. **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. Ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, RS: Gênese, 1999. p. 9 – 26.

BERTHELET, M.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, Netherlands, v.138, n. 1, p. 17-22, apr. 1996.

BRADY, N. C. **Natureza e propriedades dos solos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1989. 898 p.

BRUCE, K. D.; HIORNS, W. D.; HOBMAN, J. L.; OSBORN, A. M.; STRIKE, P.; RITCHIE, D. A. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 10, p. 3413-3416, oct. 1992.

BULL, A. T.; WARD, A. C. & GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, USA, v. 64, n. 3, p. 576-606, sep. 2000.

BÜRGMANN, H., PESARO, M., WIDMER, F.; ZEYER, J. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, Netherlands, v. 45, n. 1, p. 7 - 20, may 2001.

neutralização das cargas presentes (Volossiuk et al., 1995; Frostegård et al., 1999).

Além da interferência na quantidade de DNA extraído, o solo também interfere na qualidade, seja relacionado com o tamanho dos fragmentos ou com a pureza do DNA extraído. Com relação ao tamanho do DNA extraído, tem-se observado que o tamanho das partículas do solo e seu atrito com as biomoléculas livres têm contribuído para uma maior fragmentação do DNA (Clegg et al., 1997; Bürgmann et al., 2001; Tsai & Olson, 1991). O principal problema relacionado a pureza do extrato de DNA refere-se as substâncias húmicas presentes, já que as mesmas compartilham características muito semelhantes as do DNA, pois são macromoléculas de caráter ácido que precipitam na mesma faixa de pH que o DNA (Torsvik, 1995). Essas substâncias têm a capacidade de inibir uma grande variedade de processos moleculares como, por exemplo, a reação de amplificação do DNA (PCR), a digestão com endonucleases, reações de hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA e transformações de células competentes (Steffan & Atlas, 1988; Tsai & Olson, 1991; Tebbe & Vahjem, 1993; Yates et al., 1997; Alm et al., 2000). Como não se conhece em profundidade a estrutura básica desse grupo de moléculas, é aceitável que os diversos mecanismos propostos para sua ação inibitória gerem discussões sobre o assunto. Tsai & Olson (1991) especulam que as substâncias húmicas podem atuar sobre a PCR através da inibição da atividade da enzima DNA polimerase ou através da sua ligação com as seqüências iniciadoras, o que provocaria a diminuição da sensibilidade da detecção. Outra possibilidade é que essas substâncias impediriam a amplificação através de sua ligação com a enzima DNA polimerase ou com o DNA alvo.

Os protocolos de extração de DNA de amostras do solo utilizam duas abordagens principais. A primeira é a extração indireta, que consiste numa etapa prévia de separação dos microrganismos a partir da matriz do solo através do processo de centrifugação diferenciada antes da realização da lise celular. A segunda é a extração direta, onde a lise das células é feita quando estas ainda estão na matriz do solo, eliminando-se assim a etapa prévia de

fracionamento das células através da centrifugação. Estudos têm mostrado que, se por um lado os métodos de extração direta produzem um DNA com menor grau de pureza, por outro o seu rendimento é consideravelmente maior do que o obtido quando comparado com os métodos de extração indireta.

Dessa forma, com o surgimento de métodos de purificação cada vez mais eficazes, a maioria dos novos protocolos tem se baseado na abordagem de extração direta. Em geral, estes protocolos têm como principal preocupação a obtenção de um DNA em maior quantidade, o mais representativo possível dos microrganismos presentes no ambiente, e com melhor qualidade, no que diz respeito à pureza e à integridade.

#### *2.1 - Aspectos Físicos e Químicos do Solo e seu Potencial de Interação com os Ácidos nucleicos.*

Os quatro componentes principais do solo são as substâncias minerais, matéria orgânica, água e ar, porém a proporção de cada um desses componentes varia de acordo com o tipo de solo (Brady, 1989). O agrupamento dos constituintes minerais do solo de acordo com seu tamanho tem sido uma forma bem sucedida para sua classificação. Em geral, os grupos surgidos dessa classificação denominados frações granulométrica são: o cascalho, a areia, o silte e a argila. Quanto ao componente matéria orgânica, sua origem é decorrente principalmente da decomposição de resíduos de origem animal e vegetal, iniciada pela ação da mesofauna e posteriormente por microrganismos decompositores (Bayer & Mielniczuk, 1999). A composição básica da matéria orgânica do solo é de resíduos de tecidos parcialmente decompostos e substâncias húmicas.

Embora, a maioria das frações, que compõe os constituintes minerais e da matéria orgânica do solo, apresente alguma função sobre o mesmo, são os componentes coloidais que representam a parcela mais ativa do solo. Os colóides, representados pelos menores constituintes da fração argila e pelas substâncias húmicas, são os responsáveis pela regulação de propriedades físicas e químicas do solo e se caracterizam pela grande superfície de cargas específicas (área externa por unidade de volume) responsáveis pela

## **4 – Considerações finais sobre a aplicação destas técnicas na Ecologia Microbiana.**

---

A busca contínua de informação capaz de responder a uma grande variedade de questões associadas à diversidade, dinâmica e funcionalidade das comunidades de microrganismos presentes em diferentes ecossistemas tem sido fundamental para a evolução das pesquisas e desenvolvimento de metodologias aplicáveis a microbiologia ambiental.

Durante séculos, as informações geradas sobre a ecologia microbiana foram baseadas em estudos dependentes do isolamento e cultivo dos microrganismos presentes nos solos, plantas, rios e oceanos, além de outras fontes. Nestes estudos, as técnicas utilizadas para a caracterização dos microrganismos eram aplicadas em condições adversas das quais eles se encontram quando associados aos seus habitats.

Desde a primeira descrição de isolamento de ácidos nucleicos de microrganismos diretamente a partir de amostra de solo, diversos autores têm utilizado a estratégia de isolar ácidos nucleicos (DNA e RNA), a partir de microrganismos presentes no ambiente, independente de aplicação de técnicas tradicionais de cultivo e isolamento, para responder diversas questões. Esta abordagem tem sido muito importante principalmente pela conscientização de que as populações de microrganismos presentes nos sítios de estudo estão sujeitas a influência de diversos fatores, por exemplo, a estrutura do solo, tipo de manejo aplicado e espécie vegetal cultivada.

É importante salientar que apesar da crescente aplicação desta abordagem nos estudos de ecologia microbiana, a prática do isolamento é essencial para garantir o conhecimento e a caracterização filogenética do(s) microrganismo(s) que participam dos diversos processos biológicos. Desta forma, a geração de informação rápida que permita estabelecer o foco das pesquisas na área de ecologia microbiana, microbiologia do solo, biotecnologia, entre outras, ganham maior eficiência na busca de agentes e/ou soluções para implementar processos biológicos essenciais para garantir a qualidade do meio ambiente.

Nested ou heminested-PCR – é feita através do processamento de duas etapas de PCR. Na segunda rodada é utilizado um par de seqüências iniciadoras (para o nested PCR) que reconhecem uma região interna do produto da amplificação da primeira reação. No caso do heminested PCR, é utilizado uma das seqüências iniciadoras usadas na primeira reação, sendo que a outra seqüência iniciadora irá reconhecer uma região interna dos produtos de PCR utilizados na primeira reação. Com isso, além de ocorrer uma diluição de possíveis moléculas inibidoras presentes na amostra, também ocorrerá um aumento na proporção de seqüência alvos na amostra entre a primeira e a segunda etapa da reação.

Booster PCR – os primeiros 20 ciclos da reação são realizados com uma baixa concentração de seqüências iniciadoras, seguida do aumento da concentração dessas seqüências nos ciclos finais. Essa estratégia não só dificulta a formação de dímeros de seqüência iniciadora como também melhora a capacidade de amplificação de seqüência presentes em baixo número.

Touchdown PCR (TD-PCR) – a temperatura de anelamento é diminuída à medida que se aumenta o número de ciclos da reação. Com isso as seqüências iniciadoras terão uma maior probabilidade de se alinhar com os seus sítios de reconhecimento com uma maior especificidade nos ciclos iniciais.

PCR duplo – Da mesma forma que o nested e heminested PCR, aqui também se processam duas etapas de amplificação. No entanto, as seqüências iniciadoras da primeira e da segunda reação são as mesmas. Após a primeira amplificação uma alíquota do material amplificado é retirada e adicionada a uma nova mistura de PCR (com as mesmas seqüências iniciais), onde se processará uma nova reação. Essa estratégia apresenta bons resultados quando se deseja amplificar o DNA de um microrganismo que se encontra em pequena quantidade do ambiente, além de promover uma diluição de possíveis moléculas inibidoras da reação.

atração de íons e água (Brady, 1989; Robert & Chenu, 1992). A argila representa a fração menor que 0,002 mm e sua organização mineralógica é bastante variável, sendo as mais importantes às argilas em forma de filossilicatos (Brady, 1989). Os fitossilicatos são caracterizados por lâminas alternadas compostas de placas de cátions minerais circundados e ligados entre si por placas de ânions e hidroxila. São dois os tipos de lâminas, a tetraédrica, dominada por silício e a octaédrica, dominada por alumínio ou magnésio. As cargas (positivas ou negativas) das argilas podem surgir tanto por substituições isomórficas dos elementos centrais dos dois tipos de lâminas por outros elementos de raio iônico semelhante, ou por variação no pH do meio (Brady, 1989). Por sua vez, as substâncias húmicas são produtos da evolução da matéria orgânica, representadas por compostos de coloração escura e elevado peso molecular, os quais se diferenciam em três frações principais de acordo com suas características de solubilidade em diferentes pHs: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas (Camargo et al., 1999). Em geral os ácidos húmicos são formados basicamente por um conjunto de estrutura aromáticas e alifáticas, com uma estrutura contendo espaços vazios de diferentes tamanhos. Porém, apesar das substâncias húmicas já serem alvo de estudo desde o início do século XIX, ainda não existe uma definição clara sobre a descrição de sua estrutura molecular (Camargo et al., 1999), o que provavelmente está associado a sua grande complexidade, pois são compostas por uma mistura heterogênea de moléculas poliméricas. Apesar disso, Camargo et al. (1999) destacam características como: Polifuncionalidade - que é a existência de vários grupos funcionais, com ampla faixa de reatividade - e Flexibilidade Estrutural - capacidade de associar-se intermolecularmente e mudar a conformação molecular em resposta à variação do pH. Os grupamentos constituintes dessas moléculas são os grupos carboxílico, fenólico, metoxil e amino. Destes, o grupo carboxílico parece ser o que mais contribui para a capacidade de troca de cátions do solo, quando eles se dissociam a diferentes pHs (Stotzky, 1997). Da mesma forma que ocorre para algumas argilas silicatadas, as cargas negativas das substâncias húmicas também são dependente do pH (Brady et al., 1989).

## 2.2 – Extração do DNA do solo

Desde o início da década de 1980, quando Torsvik aplicou os ácidos nucléicos derivados de amostras ambientais para estudo da ecologia microbiana, vários protocolos têm sido propostos promovendo uma verdadeira revolução no que se diz respeito à extração de DNA do solo.

Os protocolos pioneiros requeriam uma grande quantidade inicial de solo (até 100g), reagentes e equipamentos de maior porte; além de um longo período de tempo para o processamento das amostras (dias) (Torsvik, 1980; Ogram et al., 1988; Holben et al., 1988; Steffan & Atlas, 1988). No entanto, como lembrado por Trevors (1996a), os protocolos que utilizam amostras de tamanho pequeno, além de proporcionar um aumento do número de amostras processadas e redução no período de processamento, também permitem uma maior precisão nos estudos de ecologia microbiana. Segundo estes autores, o aumento do número de repetições permite a obtenção de dados mais representativos pois as seqüência de DNA ou os microrganismos de interesse muitas vezes não se encontram homoganeamente distribuídos no ambiente. Desta forma, ao longo dos anos em que se tem aplicado esta estratégia no estudo da ecologia microbiana estes protocolos têm sido progressivamente modificados ou substituídos por outros que requerem uma pequena quantidade de amostra, reagente e tempo de processamento (horas).

Os protocolos de extração de DNA precisam ser processos simples e rápidos que permitam analisar um maior número de amostras sem perder a reprodutibilidade. Contudo, independente das modificações feitas, em todos os protocolos descritos pode-se identificar cinco etapas básicas no processo, (a) lise da célula; (b) extração dos ácidos nucléicos; (c) concentração dos ácidos nucléicos; (d) precipitação de impurezas e, (e) purificação, com finalidade de eliminar alguns grupos de contaminantes que ainda permaneçam associados ao DNA (ex.: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, proteínas, RNA, fenol), substâncias estas que teriam a capacidade de inibir os estudos moleculares posteriores.

Cullen et al. (1998) otimizando uma reação de PCR para a detecção de duas estirpes geneticamente modificada de *Rhizobium leguminosarum* observaram que o uso de formamida e BSA na PCR, além de proporcionar o melhor rendimento do produto, também aumentou a sensibilidade da técnica. Os autores conseguiram detectar uma das estirpes quando se encontrava numa faixa de 20 células por grama de solo. Yeates et al., (1997) usaram um produto comercial como aditivo (Genereleaser®) na reação de PCR para promover o seqüestro de inibidores e assim promover a amplificação do DNA bruto extraído do solo. Tebbe & Vahjem (1993) e Vahjen & Tebbe (1994) utilizaram a proteína 32 do gene T4 aliada ao uso de uma *Taq* DNA polimerase adequada e conseguiram melhorar o limite de detecção de microrganismos no ambiente. Segundo estes autores, os benefícios daquela proteína podem estar relacionados com a sua habilidade de estabilizar a fita simples de DNA durante o anelamento e a extensão das seqüências iniciadoras.

## 3.3 – Variações da técnica de PCR.

Ao longo dos anos de aplicação da técnica de PCR novos conceitos foram introduzidos em conseqüência de modificações no procedimento básico da reação ou no emprego de novas estratégias. Dentre estas, as mais utilizadas nos estudos de ecologia molecular são as seguintes:

Hot Start – é o impedimento do início da reação da PCR em temperaturas baixas. Para isso pode-se utilizar diferentes artifícios. O mais simples deles, denominado Hot Start manual, é feito através da adição de um dos componentes da reação, geralmente a DNA polimerase, no entanto também pode ser a seqüência iniciadora ou as bases nucleotídicas (Moré et al., 1994) na mistura apenas quando a mesma está a uma alta temperatura (geralmente a de anelamento). Com isso, é impedido o início da polimerização a baixas temperaturas. A formação de produtos inespecíficos é impedida, pois a reação só ocorrerá quando a mesma estiver sob uma alta condição de estringência.

### 3.2 – Parâmetros da reação que requerem otimização

A otimização da PCR geralmente é feita visando solucionar problemas como a formação de produtos indesejáveis, o não aparecimento de produtos ou o aparecimento de bandas com baixa intensidade (Roux, 1995). Para isso, são necessárias modificações em alguns dos parâmetros da técnica como, por exemplo, ajuste na concentração de alguns componentes da reação, adição de aditivos, alterações nos ciclos de temperatura e, nas próprias temperaturas da reação, principalmente na de anelamento das seqüências iniciadoras (Roux, 1995; Cullen et al., 1998).

Em diversas literaturas, os autores citam a relação entre o  $Mg^{++}$  e o dNTP como um fator crítico para a eficiência da reação. Aumentos na concentração de dNTP provocam uma diminuição na concentração de íons  $Mg^{2+}$  livres devido a capacidade dessas moléculas quelarem cátions.

Outra estratégia que pode ser utilizada para a estabilização da PCR é a inclusão de aditivos como reagentes durante o preparo da mistura de reação. Em geral estas substâncias são proteínas, detergentes ou solventes orgânicos que agem promovendo a melhoria na quantidade e qualidade do produto de amplificação, cada um de uma forma diferente. Os aditivos mais comumente utilizados são a proteína 32 do gene T4, a albumina de soro bovino (BSA), co-solventes do tipo DMSO, glicerol, formamida, acetamida, Tween 20, como também detergentes, entre outros (Sarkar et al., 1990; Reysenbach et al., 1992; Tebbe & Vahjen 1993; Yeates et al., 1997; Cullen et al., 1998; Cullen & Hirsch, 1998). Esses aditivos são considerados essenciais para o sucesso da amplificação em algumas reações (Pomp & Medrano, 1991 - citado por Roux, 1995). Como revisado por Abu Al-Soud & Rådstrom (2000), o aumento da eficiência da amplificação através desses aditivos pode ocorrer através do impedimento da ação de substâncias inibidoras, do aumento da especificidade da reação, de desnaturação de seqüências ricas em GC ou do aumento da fidelidade da reação.

Abaixo estão caracterizadas as etapas básicas dos processos de extração de DNA do solo e alguns procedimentos aplicados de acordo com o revisado por Rosado et al. (1997) e Valadares-Inglis & Melo (1998).

a) Lise da célula para liberação dos ácidos nucléicos ou precipitação das células seguida de sua lise:

Conforme revisado por Miller et al. (1999), a lise pode ser realizada, de forma independente ou combinada, por três grupos de métodos diferentes:

a.1) Lise enzimática: para provocar a digestão enzimática da parede celular. Nesse caso geralmente se utiliza a lisozima (Jacobsen & Rasmussen, 1992; Torsvik, 1980; Tsay & Olson, 1991; Porteous et al., 1994; Clegg et al., 1997), proteinase K (Zhou et al., 1996; Wikström et al., 1996; Clegg et al., 1997) ou Proteinase E (Holben et al., 1988; Jacobsen & Rasmussen, 1992);

a.2) Lise química: utiliza-se detergentes como SDS (Ogram et al., 1997; Bruce et al. 1992; Zhou et al., 1996; Wikström et al., 1996; Smalla et al., 1993; Jacobsen & Rasmussen 1992; Tsay & Olson, 1991; Moré et al., 1994; Wikström et al., 1996; Clegg et al., 1997; Cullen & Hirsch, 1998), sarcosil (Holben et al., 1988) ou guanidina isotiocionato/tiocionato (Porteous et al., 1994; Orsini & Romano-Spica, 2001) para promover o rompimento da membrana plasmática ou da parede celular;

a.3) Lise Física: neste caso são utilizados processos abrasivos como homogeneização na presença de pérolas de vidro (Ogram et al., 1987; Moré et al. 1994; Smalla et al., 1993; Van Elsas et al., 1997; Lévesque et al., 1997; Cullen & Hirsch, 1998), maceração na presença de nitrogênio líquido (Zhou et al., 1996), choque térmico ou rompimento térmico através do calor produzido por um forno de microondas (Tsai & Olson, 1991; Zhou et al., 1996; Wikström et al., 1996; Clegg et al., 1997; Orsini & Romano-Spica, 2001).

b) Extração de ácidos nucléicos.

É a solubilização diferencial do DNA em solução aquosa por

bipartição em solventes orgânicos com afinidades para proteína, lipídeos, polissacarídeos e outros resíduos derivados de constituintes celulares. É feita geralmente através do uso de fenol e/ou misturas de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico e clorofórmio:álcool-isoamílico (Tsay & Olson 1991; Smalla et al., 1993; Van Elsas et al., 1997; Bruce et al. 1992; Ogram et al., 1987; Bruce et al., 1992; Orsini & Romano-Spica, 2001; Zhou et al., 1996; Wikström et al., 1996; Lévesque et al., 1997; Clegg et al., 1997). Alternativamente, podem ser utilizadas outras estratégias, como cromatografia de afinidade ou resinas de troca catiônica, porém a presença de grande quantidade de resíduos orgânicos pode interferir no rendimento da extração.

### c) Precipitação dos ácidos nucleicos

O processo de precipitação é geralmente realizado através do uso de etanol, isopropanol ou polietilenoglicol (PEG) (Tsai & Olson, 1991; Bruce et al., 1992; Moré et al., 1994; Porteous et al., 1994; Zhou et al., 1996; Ogram et al., 1987; Cullen & Hirsch, 1998; Krsek & Wellington, 1999; Orsini & Romano-Spica 2001). Na maioria dos protocolos esse processo é realizado através do uso de etanol. Entretanto, alguns protocolos têm optado pelo uso de isopropanol devido a suas propriedades de cargas que permite que seja usado apenas 0,6 volumes de isopropanol para precipitar um volume de DNA extraído, enquanto que são necessários 2 volumes de etanol para cada volume de DNA extraído. Cullen & Hirsch (1998) compararam o desempenho dessas três substâncias quanto a quantidade e pureza (em relação a presença de substâncias húmicas) do DNA extraído. Os resultados mostraram que o uso de etanol resultou na menor quantidade de DNA precipitado e no maior índice de co-precipitação de substâncias húmicas. Esta diferença não foi observada quando se utilizou o isopropanol ou PEG, porém este último interferiu na reação de PCR conforme observado pelos mesmos autores. Após a precipitação, o DNA deve ser ressuspensionado em tampão, geralmente T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA pH 8.0) ou em água ultra-pura.

introdução de aditivos, conseguiram detectar a presença da levedura *Hansenula polymorpha*, quando na concentração de apenas 10 células por grama de solo. Quando o DNA amplificado foi aliado à técnica de hibridização, foi possível detectar a presença de até 1 célula de *Pseudomonas cepacia* por grama de solo, ao passo que quando o teste de detecção foi feito com DNA não amplificado, o limite de detecção foi de 10<sup>4</sup> células por grama de solo (Steffan & Atlas, 1988). Dessa forma, foi observado que a amplificação do DNA aumentou em três ordens de grandeza a capacidade de detecção de microrganismos no ambiente.

Apesar disso, a técnica de PCR geralmente é comprometida por fatores relacionados a presença de uma grande variedade de substâncias que são isoladas juntamente com o DNA e a baixa quantidade de DNA alvo na amostra, que podem comprometer a aplicação dessa técnica devido a problemas relacionados à inibição ou à diminuição da sensibilidade da detecção.

### 3.1 – Fatores que interferem com a aplicação da técnica de PCR em amostras ambientais.

No caso do solo, existe uma grande diversidade de substâncias que podem causar inibição química como, por exemplo, a presença de proteínas (Krsek & Wellington, 1999), de íons metálicos e de substâncias húmicas, principalmente ácidos húmicos ou fúlvicos, ou inibição física, devido a contaminação com argila (Pepper, 1997). Tsay & Olson (1992a) atribuíram à presença de substâncias húmicas ou de íons metálicos a diminuição na amplificação do DNA obtido do ambiente em relação a amplificação do DNA isolado de cultura pura. Tsay & Olson (1992b) verificaram que a presença de apenas 10 ng de um ácido húmico comercial na reação foi capaz de inibir a reação de PCR. Krsek & Wellington (1999) ao compararem vários métodos de extração de DNA do solo, observaram que o sucesso na amplificação do DNA produzido por qualquer dos métodos estava diretamente relacionado com a leitura da relação A260/A280 da amostra de DNA usada como fita molde, que mede a contaminação com proteínas em relação ao teor de ácidos nucleicos da amostra.

Esta técnica de amplificação enzimática *in vitro* de um DNA alvo a partir de quantidades variáveis desse DNA molde foi desenvolvida na década de 80, baseada no conhecimento do processo de duplicação do DNA. É atualmente um processo bem conhecido e se dá através da utilização de alguns componentes básicos: um par de seqüências iniciadoras - formadas por seqüências de bases nucleotídicas em fita única que irão flanquear a região do DNA alvo; uma enzima termoestável - Taq DNA polimerase; precursores da síntese dos ácidos nucleicos - bases nucleotídicas; e cofatores. Um conjunto de três temperaturas pré-estabelecidas que se alternam em vários ciclos promove a abertura da dupla fita, permitindo o anelamento das seqüências iniciadoras com os seus sítios de reconhecimento no DNA alvo e polimerização de uma nova seqüência de DNA.

Apesar da PCR ter sido idealizada para utilizar o DNA oriundo de microrganismos previamente isolados, o uso de ácidos nucleicos obtidos diretamente do ambiente vem se popularizando no meio científico como previsto por Steffan & Atlas (1991). Dessa forma, como essa estratégia independe do plaqueamento sua aplicação tem contribuído para o estudo da “verdadeira diversidade” microbiana, apesar das limitações inerentes a todas as técnicas (Pepper, 1997; von Wintzingerode et al., 1997). Além disso, ela tem trazido grande contribuição para o monitoramento de microrganismos geneticamente modificado ou não, inoculados ou liberados acidentalmente no ambiente, e na detecção de microrganismos patogênicos, principalmente quando estes se encontram num estado viável e não culturável (Steffan & Atlas, 1991; Van Elsas et al., 1998).

Vários estudos têm mostrado que essa técnica tem uma grande capacidade de detectar microrganismos, mesmos quando esses estão em número muito baixo no ambiente. Tsay & Olson (1992) utilizando como fita molde na reação de PCR um DNA extraído diretamente do ambiente, conseguiram detectar *Escherichia coli* numa concentração igual a 70 células por grama de solo. Tebbe & Vahjen (1993), após terem otimizado a reação de PCR através da escolha de uma determinada Taq DNA polimerase comercial e

d) Precipitação de impurezas.

Essa é uma etapa que deve ser realizada previamente à purificação do DNA bruto. Sua grande importância reside no fato de que, além de contribuir para a retirada de substâncias inibitórias (SDS, RNA, proteínas, polissacarídeos, substâncias húmicas e restos celulares) presentes no material extraído, facilita a etapa final de purificação quando são usados diferentes tipos de resinas, uma vez que algumas moléculas contaminantes podem atuar, impedido a ligação do DNA com estas resinas (Zhou et al., 1996). A realização desta etapa é variável em cada protocolo, podendo ocorrer no início do protocolo de extração, durante ou após a etapa de lise. Essa etapa pode ser feita utilizando-se: PVPP nos tampões de incubação (Holben et al., 1988; Cullen & Hirsch, 1998) ou adicionado em colunas de purificação (Berthelet et al., 1996; Clegg et al., 1997), CTAB (Van Elsas et al., 1997; Wikström et al., 1996; Zhou et al., 1996); precipitação com CsCl associado ou não ao uso de acetato de potássio (Van Elsas et al., 1997; Ogram et al., 1987; Cullen & Hirsch, 1998); precipitação com acetato de amônio (Steffan & Atlas, 1988; Moré et al., 1994) entre outros.

Contudo, poucos são os protocolos que deixam a cargo de um único reagente/produto o processo de purificação. Esta consideração é importante uma vez que a etapa de purificação deve ter uma ampla faixa de especificidade principalmente no caso do solo, onde existe uma grande variedade de moléculas que podem ser extraídas juntamente com o DNA.

e) Purificação de Ácidos Nucleicos.

O aumento da eficiência dos processos de lise celular, provocado pela necessidade de se obter um maior rendimento de DNA aliado à diversidade de células microbianas, tem contribuído para o aumento de substâncias que co-precipitam com o DNA e que podem impedir um grande número de reações moleculares. São vários os métodos disponíveis baseados nos princípios de purificação, eles podem diferir em relação ao preço, tempo de processamento, percentual de perda de DNA e capacidade de eliminação de substâncias estranhas.

Os primeiros trabalhos realizavam a purificação do DNA bruto através de processos demorados como cromatografia em coluna de hidroxiapatita e centrifugação diferencial utilizando CsCl-EtBr (Torsvik, 1980; Van Elsas et al., 1997; Holben et al., 1988; Steffan & Atlas, 1988; Jacobsen & Rasmussen, 1992; Ogram et al., 1987; Bruce et al., 1992; Clegg et al., 1997). Contudo, a necessidade de agilizar o processamento das amostras fez com que ao longo do tempo esses métodos tediosos fossem substituídos por processos mais simples como o uso de eletroforese em gel de agarose (Myrold et al., 1995; Porteous et al., 1994; Zhou et al., 1996; Young et al., 1993). Atualmente, produtos mais rápidos e eficientes, com diferentes propriedades de purificação, são encontrados no mercado como por exemplo resinas separadora por tamanho (Kuske et al., 1998; Tsay & Olson, 1992 a e b; Cullen & Hirsch, 1998; Miller, 2001); resina de troca iônica (Torsvik, 1980; Van Elsas et al., 1997, Moré et al., 1994; Zhou et al., 1996; Tebbe & Vahjen, 1993) e resina pH dependente.

Dentro desse processo de “evolução” dos protocolos de extração de ácidos nucleicos do ambiente, novos protocolos têm sido criados como também se tem sugerido modificações em protocolos pré-existentes.

Os novos protocolos, assim como os modificados, têm se preocupado em produzir extratos de ácidos nucleicos com maior rendimento, qualidade em relação a pureza e fragmentação, e eficiência na amostragem, visando garantir abrangência nos estudos da diversidade de microrganismos e/ou tipos possíveis de células. Além da demanda por simplicidade e rapidez, também é esperado que estes protocolos sejam eficazes em solo e sedimentos com diferentes características físicas, químicas e que apresentam diferentes teores de matéria orgânica (Ogram et al., 1987; Bruce et al., 1992; Zhou et al., 1996; Wikström et al., 1996; Lévesque et al., 1997; Van Elsas et al., 1997; Selbach, 1998; Miller et al., 1999).

Os protocolos de extração de DNA de amostras do solo utilizam duas abordagens principais. A primeira é a extração indireta, que consiste numa etapa prévia de separação dos microrganismos a

e guanidina isotiocianato. Moré et al. (1994) observaram que a lise feita com SDS aliado ao uso do “bead beater” não resultava somente num maior rendimento, como também em maior eficiência na lise de células mais resistentes, como é o caso de endosporos. Além disso, este processo foi capaz de mostrar uma maior diversidade de microrganismos, apesar de observações ao microscópio mostrarem que mesmo após esse tratamento era possível observar a presença de células diminutas aparentemente intactas. Posteriormente, Berthelet et al. (1996) adaptaram este protocolo adicionando um passo de purificação através de uma coluna de purificação contendo PVPP (“PVPP spin column purification”). Dessa forma aqueles autores foram capazes de obter um DNA apto para a amplificação pelo método da PCR na metade do tempo requerido pelo protocolo desenvolvido por Moré et al. (1994). Zhou et al. (1996) fizeram um estudo para o estabelecimento de um protocolo de extração de DNA de solo, onde foram testados vários tipos de processo de lises e de purificação. Os autores observaram que o método de lise baseado principalmente no uso do SDS foi pouco eficiente na obtenção de DNA de microrganismos Gram positivo. Uma maior eficiência foi observada quando incluíram as etapas de maceração em nitrogênio líquido e de choque térmico, através do congelamento e descongelamento. Quanto ao processo de purificação, eles observaram que esta etapa irá depender do uso posterior que se deseja para o DNA. Dependendo do método escolhido, pode se ter um maior rendimento ou um DNA com maior pureza.

### **3 - Aplicação da PCR na Microbiologia Ambiental**

---

Um importante aliado da ecologia molecular microbiana é a técnica da PCR, que tem a capacidade de multiplicar *in vitro* a quantidade de DNA alvo em um curto espaço de tempo e a um custo relativamente baixo. Quando essa técnica é utilizada para amplificar o DNA extraído diretamente do ambiente, é possível detectar microrganismos presentes em pequenas quantidades, independente de serem capazes de crescer ou não em meio de cultura.

cloreto de céσιο e de hidroxiapatita. O desenvolvimento dos métodos direto de extração de DNA representou, até certo ponto, uma grande revolução nas técnicas de obtenção de DNA do ambiente, uma vez que a maioria dos novos protocolos propostos tem utilizado a mesma abordagem como, por exemplo, os protocolos de Selenska & Klingmüller (1991); Tsai & Olson (1991); Zhou et al. (1996); Kuske et al. (1998); Cullen & Hirsch (1998); Smalla et al. (1993) e Selbach (1998).

O protocolo desenvolvido por Selenska & Klingmüller (1991) faz a extração direta do DNA das células através do tratamento com SDS a 70°C, seguido de precipitação usando PEG e sucessivas purificações com centrifugação diferenciada com brometo de etídio - cloreto de céσιο. Os autores foram capazes de detectar, através de hibridização em "Southern blotting", a presença da seqüência *Tn5* inserida no genoma da bactéria *Enterobacter agglomerans*, 70 dias após essa bactéria ter sido liberada no solo. Bruce et al. (1992) utilizaram o protocolo desenvolvido por Selenska & Klingmüller (1991) acrescentando a estes algumas modificações como adição da etapa de extração com fenol:clorofórmio e precipitação com etanol, para amplificar a seqüência de DNA de microrganismos que não tinham sido previamente inoculados. Tsai & Olson (1991) seguindo o mesmo modelo de Ogram et al. (1987), propuseram outro protocolo de extração de DNA de amostras de solo e de sedimento, no qual efetuavam a lise das células microbianas através do uso de lisozima e de processo físico de choque térmico - ciclos de congelamento-descongelamento ("freeze-thaw"). Neste protocolo, foram eliminados os demorados processos de purificação que incluem a centrifugação em gradiente de sedimentação com cloreto de céσιο e com coluna de hidroxiapatita. Dessa maneira, os autores conseguiram diminuir o tempo de processamento das amostras e obtiveram um maior rendimento de DNA com alto grau de pureza. Posteriormente, Porteous et al. (1994) desenvolveram e comprovaram o potencial de um protocolo na extração de DNA de microrganismos (fungos e bactérias) associados a uma larga diversidade de solos e plantas. O protocolo baseia-se numa seqüência de lises feita através do processo de sonicação, lisozima

partir da matriz do solo através do processo de centrifugação diferenciada antes da realização da lise celular. A segunda é a extração direta, onde a lise das células é feita quando estas ainda estão na matriz do solo, eliminando-se assim a etapa prévia de fracionamento das células através da centrifugação. Inicialmente Torsvik (1980) desenvolveu um protocolo que possuía uma etapa inicial de centrifugação diferencial, baseado em modificação no protocolo de Faegri et al. (1977), para a separação das células microbianas e, só depois a lise era efetuada com sarcosil e lisozima (método de extração indireta). Quase uma década depois, foi desenvolvido um protocolo onde a lise das células microbianas, feita através do uso de dodecil sulfato de sódio (SDS) a uma temperatura de 70°C, ocorria com os microrganismos ainda presentes na matriz do solo (Ogram et al., 1987) (método de extração direta).

Estudos têm mostrado que, se por um lado os métodos de extração direta produzem um DNA com menor grau de pureza, por outro o seu rendimento é consideravelmente maior do que o obtido quando comparado com os métodos de extração indireta.

Dessa forma, com o surgimento de métodos de purificação cada vez mais eficazes, os novos protocolos, em sua maioria, estão baseados na abordagem de extração direta. Em geral, estes protocolos têm como principal preocupação à obtenção de um DNA em maior quantidade, o mais representativo possível dos microrganismos presentes no ambiente, e qualidade, no que diz respeito à pureza e à integridade.

### 2.2.1 - Métodos indiretos de extração de DNA

O protocolo descrito por Torsvik (1980) foi o pioneiro na extração de DNA de microrganismos do ambiente. Neste protocolo foi introduzida uma etapa prévia de fracionamento das células microbianas por centrifugação como descrito por Faegri et al. (1977). Em seguida se processava a lise das células bacterianas através do uso de lisozima e SDS, seguida de purificação através do uso de cromatografia em coluna de hidroxiapatita.

Quase uma década depois, Holben et al. (1988) introduziu algumas modificações nas etapas de centrifugação diferencial desenvolvida por Faegri et al. (1977) e de lise da célula. Uma das modificações consistiu na adição de ascorbato de sódio e polivinilpolipirrolidona (PVPP) na etapa de centrifugação diferencial, para prevenir a oxidação de compostos fenólicos e garantir a remoção destes compostos por adsorção, respectivamente. Quanto à lise, Holben et al. (1988) utilizou vários agentes para garantir a eficiência no rompimento das células de diversos tipos de microrganismos. Entre os agentes utilizados estão: sarcosil, lizozima e pronase. Através desse protocolo foram obtidos extratos de ácido nucléico com maior quantidade e pureza, em comparação com outros descritos anteriormente, através da substituição da coluna de hidroxapatita por centrifugação em equilíbrio de densidade com cloreto de cério.

Concomitante às modificações introduzidas por Holben et al. (1988), Steffan & Atlas (1988) propuseram modificações no protocolo de fracionamento de microrganismos desenvolvidos por Faegri et al. (1977) e no protocolo de lise desenvolvido por Torsvik (1980). As principais modificações introduzidas ao protocolo de Faegri et al. (1977) foram a substituição de alguns tampões de lavagem e a adição de alguns passos de lavagem com o objetivo de eliminar a presença de contaminantes orgânicos. Quanto à etapa de lise, a modificação foi apenas relacionada ao tempo de lise da célula microbiana através da ação da lizozima.

Um outro protocolo de fracionamento de células foi desenvolvido por Pillai et al. (1991) onde as células foram obtidas através de centrifugação em um gradiente de sacarose. Neste caso, as células obtidas dos microrganismos foram usadas diretamente na reação de PCR. Pode-se notar que as grandes vantagens desse protocolo foram sua grande simplicidade e rapidez, uma vez que mesmo não contendo etapas de eliminação de substâncias húmicas ou de lise celular esse protocolo aliado a uma dupla PCR apresentou-se com sensibilidade suficiente para detectar um número de 1 até 10 UFC por grama de solo. Jacobsen & Rasmussen (1992) também propuseram um protocolo de extração de DNA do ambiente que tinha como maiores vantagens a sua rapidez de processamento. Os

autores fizeram uso do protocolo de fracionamento microbiano desenvolvido por Herron & Wellington (1990) que utiliza como principal inovação uma resina trocadora de cátion (Chelex 100, Bio-Rad, Copenhagen, Dinamarca). Essa resina tem a função de liberar os microrganismos que estão presos nos microporos do solo, através da dispersão das partículas de solo por meio da substituição de cátion polivalentes que contribuem com a agregação das partículas, por cátions monovalentes (Edwards & Bremmer, 1965 - citados por MacDonald, 1986). Uma outra grande vantagem desse tipo de resina seria evitar que células mais sensíveis sofressem danos caso fossem utilizados procedimentos mais drásticos para liberação dos microrganismos (MacDonald, 1986). Van Elsas et al. (1997) desenvolveram um protocolo indireto que se mostrou capaz de produzir um rendimento de DNA 4 a 5 vezes maior que o produzido pelo protocolo de Jacobsen & Rasmussen (1992). Nesse protocolo, a utilização da resina Chelex 100 foi substituída por uma etapa de agitação do solo a 200 rpm por 10 minutos na presença de pérolas de vidro além da adição de pirofosfato de solo, que segundo os autores melhora a solubilização dos agregados de solo. O processo é seguido da etapa de lise com o uso do “bead beater”, e a extração do DNA baseada no uso de fenol/clorofórmio e purificação através do uso de brometo de hexadecilmetilamonio (CTAB) e de um kit comercial (GeneClean II).

### *2.2.2 - Métodos diretos de extração de DNA*

Este tipo de protocolo foi desenvolvido por Ogram et al. (1987) e tinha como principal justificativa a eliminação de possíveis erros de amostragem, pois tem sido observado que diferentes espécies de bactérias podem estar ligadas às partículas de solo com diferentes graus de intensidade e, portanto, o processo de fracionamento das bactérias utilizado em métodos de extração indireto poderia remover apenas as bactérias que fossem facilmente liberadas das partículas de solo. Em geral esses protocolos são compostos de uma etapa de lise a 70°C com SDS e uso de “bead beater”, seguida de extração alcalina (pH 8.0), precipitação do DNA através da utilização de polietileno glicol (PEG) ou etanol e purificação através do uso do

