

MAICON RICARDO ZIEBERG PASSINI

**APERFEIÇOAMENTO DE UMA TÉCNICA PARA EXTRAIR DNA DE ÁGUA
DO MAR E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA NA
CARACTERIZAÇÃO DE UMA COMUNIDADE BACTERIANA MARINHA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantã/IPT do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO
2015

MAICON RICARDO ZIEBERG PASSINI

**APERFEIÇOAMENTO DE UMA TÉCNICA PARA EXTRAIR DNA DE ÁGUA
DO MAR E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA NA
CARACTERIZAÇÃO DE UMA COMUNIDADE BACTERIANA MARINHA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantã/IPT do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Passini, Maicon Ricardo Zieberg.

Aperfeiçoamento de uma técnica para extrair DNA de água do mar e comparação de métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha / Maicon Ricardo Zieberg Passini. -- São Paulo, 2015.

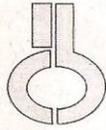
Orientador: Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Ecologia microbiana molecular.

Versão do título para o inglês: The improvement of a technique for seawater DNA extracting and the comparison of DNA extraction methods for the characterization of a marine bacterial community.

1. Ecologia microbiana 2. Ecologia molecular 3. Micro-organismos marinhos 4. Técnicas e procedimentos de laboratório 5. Extração de DNA 6. Água do mar I. Rivera, Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB05/2015



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 520/12 referente ao projeto intitulado: "*Caracterização de comunidades bacterianas marinhas por métodos independentes de cultivo utilizando o gene 16S rRNA*" sob a responsabilidade de **Maicon Ricardo Zieberg Passini**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 18 de abril de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP



À minha orientadora **Irma Nelly Gutierrez Rivera** (*in memoriam*), pelos ensinamentos e pelos bons momentos que sempre levarei comigo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À prof^a Dr^a Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memorian*), amiga e orientadora que esteve comigo compartilhando experiências, transmitindo conhecimentos, conselhos e muita força positiva do início até o fim deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado pelo aceite em me orientar na fase final deste estudo e por toda ajuda e apoio concedido.

Ao Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte, pelas dicas e sugestões fornecidas, principalmente na reta final deste trabalho.

À Dr^a Claudiana Paula de Souza Sales pela amizade, pelos ensinamentos em microbiologia e biologia molecular e por toda ajuda concedida no desenvolvimento deste estudo.

Aos professores da minha banca de qualificação, Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte, Dr^a. Elisabete José Vicente e Dr. Ricardo Harakava pelas suas valiosas considerações.

Ao Prof. Fernando Dini Andreote e ao seu orientado Thiago Gumiere pela orientação na realização e análise dos dados da técnica do DGGE.

À minha mãe Rosa Passini e irmã Kátia Passini, pelo amor e incentivo que sempre recebo.

Aos meus avós e familiares, por todo carinho e apoio. Especialmente à minha tia Irene (*in memorian*) e sua filha Kêkê pela ajuda nos primeiros passos dessa caminhada.

À minha namorada e aos seus pais, Flávio e Eliane, pelos finais de semana divertidos e relaxantes. Agradeço especialmente à minha namorada Larissa Ortolan Levy, pelo companheirismo, carinho e amor. Você deixou todo esse trabalho mais fácil.

Aos bons momentos com meus amigos do laboratório de Ecologia Microbiana Molecular, Claudiana, Bianca, Flávio, Lígia, Nadia, Thiago, Claudia, Gabriel, Caio, e é claro à amiga Vanessa.

Ao Seu Lu e à Zita, pelas inúmeras ajudas no laboratório e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ao Instituto de Oceanografia da Universidade de São Paulo e ao Centro de Biologia Marinha (CEBImar) em São Sebastião- SP pelas amostras de água.

Aos alunos, servidores e principalmente à minha chefe e amiga Prof^a Dr^a. Brenda da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP pela força e incentivo para que eu finalizasse essa etapa tão importante para minha formação.

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

RESUMO

PASSINI, M. R. Z. **Aperfeiçoamento de uma técnica para extrair DNA de água do mar e comparação de métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha.** 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os micro-organismos marinhos são os maiores pilares para a vida na Terra, sendo responsáveis por funções nos ciclos biogeoquímicos que nenhum outro organismo é capaz de realizar. Os seus produtos metabólicos podem ser utilizados em aplicações biotecnológicas e é essa a principal força motriz para estudá-los. Com as limitações das técnicas de cultivo, tornou-se necessário caracterizar molecularmente os recursos microbianos. Entretanto, como estes estudos são realizados a partir do DNA, podemos encontrar distintos resultados dependendo do DNA utilizado. Assim, essa pesquisa buscou aperfeiçoar uma técnica para extrair DNA de água do mar de modo que resultasse em DNA de boa qualidade, com alto rendimento e de forma rápida. Além disso, para demonstrar a importância dos métodos de extração de DNA no estudo dos micro-organismos por métodos independentes de cultivos, foi caracterizada, pela técnica de DGGE, a diversidade de uma comunidade bacteriana marinha usando diferentes métodos de extração de DNA. Inicialmente, foi realizado o aperfeiçoamento das etapas em uma metodologia de extração de DNA de água: processamento da amostra, lise celular, purificação e recuperação do DNA. Posteriormente, comparamos cinco métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha por DGGE. O aperfeiçoamento da metodologia de extração de DNA de água do mar resultou em um protocolo com a qualidade do DNA similar à do protocolo original, com rendimento melhor e aproximadamente quatro vezes mais rápido que o protocolo inicialmente descrito. Em relação à caracterização da comunidade, verificamos, distintos perfis da comunidade microbiana marinha, não somente em relação à presença e ausência das bandas de DNA no DGGE, mas também em relação à intensidade destas. No entanto, não observamos diferenças significativas entre riqueza e diversidade. Comparando as metodologias, vimos que a maioria das OTUs foi encontrada em todas as metodologias de extração de DNA, porém OTU exclusivas foram vistas, demonstrando que as técnicas de extração podem favorecer a detecção de algumas espécies.

Palavras-chave: Extração de DNA de água do mar. Ecologia molecular microbiana. Micro-organismos marinhos. DGGE.

ABSTRACT

PASSINI, M. R. Z. **The improvement of a technique for seawater DNA extracting and the comparison of DNA extraction methods for the characterization of a marine bacterial community.** 2015. 91 f. Dissertação (Masters thesis Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Marine microorganisms are the major pillars for life on Earth, since they are responsible for roles in biogeochemical cycles that no other organism can perform. Their metabolic products can be used in biotechnological applications and this is one of the main driving force to study them. With the limitations of culture-based techniques, it has become necessary to use molecular techniques to better characterize microbial genetic resources. However, these studies are done using directly environmental DNA, and therefore we can find different results depending on the methodology chosen for the DNA extraction. Thus, this study aimed to improve a technique for extracting DNA from sea water, in order to obtain a high quality DNA, high yield and a low time consuming protocol. Furthermore, to demonstrate the importance of the DNA extraction methods in the study of microorganisms by cultivation-independent methods, the diversity of a marine bacterial community was characterized by DGGE technique using different methods of DNA extraction. Initially, it was performed the improvement of different steps of the methodology of DNA extraction from water: sample processing, cell lysis, purification and recovery of DNA. Later, we compared five methods of DNA extraction for the characterization of a marine bacterial community by DGGE. The improved methodology of DNA extraction from seawater resulted in a protocol similar in DNA quality, with better yield and approximately four times faster than the protocol initially described. Regarding the characterization by different DNA extraction protocols, the analysis by DGGE resulted in distinct marine microbial community profiles, not only with respect to the presence or absence of DNA bands, but also to their intensity. However, was not observed significant differences in richness and diversity among the methodologies. Comparing the extraction methods, most of the OTUs were found in all methodologies, however, unique OTUs were found, demonstrating that the extraction techniques may cause bias toward the observation of some species.

Keywords: DNA extraction from seawater. Molecular microbial ecology. Marine microorganisms. DGGE.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Regiões hipervariáveis e conservadas presente no gene 16S RNAr..... | 23 |
| Figura 2 – Árvore filogenética dos domínios Bacteria, Archaea e Eucarya..... | 23 |
| Figura 3 – Caracterização de comunidades bacterianas marinhas por DGGE..... | 24 |
| Figura 4 – Metodologia de extração de DNA total água do mar de acordo com Rivera et al., 2003..... | 32 |
| Figura 5 – Processamento das membranas..... | 33 |
| Figura 6 – Local de coleta da amostra de água do mar..... | 39 |
| Figura 7 – Gel de agarose do DNA obtido a partir de 100 mL de amostras de água do mar de acordo com o protocolo descrito por Rivera et al., 2003..... | 44 |
| Figura 8 – Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar usando tubos Falcon e microtubos..... | 45 |
| Figura 9 – Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar com e sem adição de <i>glass beads</i> | 46 |
| Figura 10 – Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes concentrações finais de lisozima..... | 47 |
| Figura 11 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes concentrações finais de proteinase K..... | 49 |
| Figura 12 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes intervalos de tempos de ação de proteinase K..... | 49 |
| Figura 13 – Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes concentrações finais de CTAB..... | 51 |
| Figura 14 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando CTAB em diferentes intervalos de tempo..... | 51 |
| Figura 15 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes forças de centrifugação e intervalos de tempo com F: C: A e C: A..... | 52 |
| Figura 16 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes concentrações do coprecipitador tRNA..... | 54 |
| Figura 17 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes agentes precipitadores..... | 55 |
| Figura 18 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes tempos e velocidades de centrifugação..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes tempos de centrifugação na etapa de lavagem com etanol 70%..... | 57 |
| Figura 20 – Protocolo aperfeiçoado para extrair DNA de água do mar..... | 59 |
| Figura 21 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes volumes de água filtrada..... | 60 |
| Figura 22 – Comparação das metodologias de extração de DNA total utilizando 100 mL de água do mar..... | 62 |
| Figura 23 - Amplificação do gene 16S RNAr usando DNA extraído por diferentes metodologias..... | 63 |
| Figura 24 - Extração de DNA de 100 mL e 400 mL de água do mar utilizando diferentes métodos..... | 65 |
| Figura 25 - Média do rendimento e pureza do DNA de água do mar das diferentes metodologias de extração..... | 66 |
| Figura 26 – Posição de anelamento dos <i>primers</i> no gene 16S RNAr..... | 67 |
| Figura 27 – Amplificação do gene 16S RNAr com <i>template</i> de diferentes metodologias de extração..... | 68 |
| Figura 28 - Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) das diferentes metodologias de extração..... | 70 |
| Figura 29 - Estrutura da comunidade bacteriana marinha, por DGGE, utilizando DNA extraído por diferentes metodologias..... | 71 |
| Figura 30 - NMDS comparando os perfis gerados no DGGE a partir de DNA extraído por diferentes metodologias..... | 72 |
| Figura 31 - NMDS comparando os perfis gerados no DGGE..... | 73 |
| Figura 32 - NMDS destacando as metodologias que apresentaram menor reprodutibilidade nos perfis gerados no DGGE..... | 74 |
| Figura 33 - Diagramas de Venn comparando as OTUs das extrações realizadas com 100 mL e 400 mL..... | 75 |
| Figura 34 - Diagramas de Venn referente aos números de OTUs das cinco metodologias de extração..... | 76 |
| Figura 35 – Índice de Shannon – Wiener e Riqueza de Chao, resultante das diferentes metodologias de extração..... | 77 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Quantidades de reagentes utilizados nas extrações feitas com os tubos Falcon e com os microtubos..... | 34 |
| Tabela 2 - Primers utilizados na reação de PCR para o DGGE..... | 42 |
| Tabela 3 – Concentração do DNA em amostras de água do mar e razão $A_{260/230}$ utilizando diferentes concentrações de CTAB..... | 50 |
| Tabela 4 – Concentração de DNA e razão $A_{260/230}$ em amostras de água do mar utilizando CTAB na concentração final de 1% e diferentes intervalos de tempo..... | 51 |
| Tabela 5 - Força e tempo de centrifugação com F: C: A e C: A e sua relação quanto a concentração de DNA e razão $A_{260/280}$ | 52 |
| Tabela 6 - Comparação das metodologias de extração de DNA utilizando 100 mL de água do mar..... | 63 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Fórmulas para as análises do teste t pareado..... | 39 |
| Quadro 2 - Resumo das etapas para obtenção do protocolo de extração de DNA: Rivera et al. (2003) aperfeiçoado..... | 58 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 Objetivo geral | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos | 19 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 3.1 Diversidade microbiana marinha | 20 |
| 3.2 Métodos de estudo da diversidade microbiana | 21 |
| 3.2.1 Análise das comunidades microbianas utilizando o gene 16S RNAr | 21 |
| 3.2.2 Caracterização da comunidade bacteriana por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) | 24 |
| 3.2.2.1 Análises estatísticas de fingerprinting do DGGE | 26 |
| 3.3 Extração de DNA total: um viés no estudo da diversidade microbiana | 27 |
| 3.3.1 Métodos de extração de DNA de água | 28 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 Aperfeiçoamento da metodologia de extração de DNA de Rivera et al., 2003 | 31 |
| 4.1.1 Amostras utilizadas | 31 |
| 4.1.2 Processamento das amostras | 31 |
| 4.1.3 Técnica de extração de DNA - Rivera et al., 2003 | 31 |
| 4.2 Etapas para aperfeiçoamento da técnica de extração de DNA – Rivera et al., 2003 | 33 |
| 4.2.1 Processamento (passos 1, 2 e 3): ensaio para substituir os tubos Falcon (15 mL) por microtubos (tubos de polipropileno, 2,0 mL) | 33 |
| 4.2.2 Lise (passo 5): adição de glass beads | 34 |
| 4.2.3 Lise (passo 5): concentração de lisozima | 34 |
| 4.2.4 Lise (passos 7 e 8): concentração e tempo de ação de proteinase K | 34 |
| 4.2.5 Tratamento adicional à lise celular e purificação (passos 9 e 10): concentração final e tempo de ação do CTAB | 35 |
| 4.2.6 Purificação (passos 11 e 12): velocidade de centrifugação e intervalo de tempo com C:A | 35 |
| 4.2.7 Purificação (passos 14 e 15): velocidade de centrifugação e intervalo de tempo com C:A | 35 |
| 4.2.8 Recuperação (passo 17): concentração do agente coprecipitador (Baker's yeast tRNA) | 35 |

| | |
|--|----|
| 4.2.9 <i>Recuperação (passos 17): agentes precipitadores</i> | 36 |
| 4.2.10 <i>Recuperação (passos 19 e 20): tempo e velocidade de centrifugação para recuperar o DNA</i> | 36 |
| 4.2.11 <i>Purificação do sal residual: tempo de lavagem do DNA com etanol 70%</i> | 36 |
| 4.3 Teste de concentração de DNA recuperado por volume de água filtrada | 36 |
| 4.4 Comparação de metodologias de extração de DNA total de água do mar | 35 |
| 4.5 Análise comparativa dos métodos de extração | 37 |
| 4.5.1 <i>Análise qualitativa e quantitativa das amostras de DNA de água de mar</i> | 37 |
| 4.5.2 <i>Avaliação da integridade do do DNA usando a amplificação do gene 16S RNAr</i> | 37 |
| 4.5.3 <i>Análises estatística: Teste t pareado</i> | 38 |
| 4.6 Comparação de métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) | 39 |
| 4.6.1 <i>Coleta da amostra de água do mar</i> | 39 |
| 4.6.2 <i>Processamento das amostras coletadas</i> | 40 |
| 4.6.3 <i>Métodos de extração de DNA da água do mar</i> | 40 |
| 4.6.4 <i>Amplificação do gene 16S RNAr</i> | 41 |
| 4.6.5 <i>Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)</i> | 42 |
| 4.6.6 <i>Análise dos dados do DGGE</i> | 42 |
| 4.6.7 <i>Análises estatística: Teste de Tukey</i> | 43 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 5.1 Extração de DNA de água do mar pelo método de Rivera et al., 2003 | 44 |
| 5.2 Aperfeiçoamento do protocolo de Rivera et al., 2003 | 44 |
| 5.2.1 <i>Processamento: ensaio para substituir os tubos Falcon (15 mL) por microtubos (2,0 mL)</i> | 44 |
| 5.2.2 <i>Lise celular</i> | 45 |
| 5.2.2.1 <i>Ação das glass beads</i> | 45 |
| 5.2.2.2 <i>Concentração de lisozima</i> | 47 |
| 5.2.2.3 <i>Concentração e tempo de ação de proteinase K</i> | 48 |
| 5.2.3 <i>Tratamento adicional à lise celular e purificação: concentração final e tempo de ação do CTAB</i> | 49 |
| 5.2.4 <i>Purificação do DNA: tempo e força de centrifugação com: F: C: A e C: A</i> | 51 |
| 5.2.5 Recuperação do DNA | 53 |
| 5.2.5.1 <i>Concentrações do coprecipitador (tRNA)</i> | 53 |
| 5.2.5.2 <i>Agentes precipitadores</i> | 54 |

| | |
|--|----|
| 5.2.5.3 Tempo e velocidade de centrifugação para precipitação do DNA..... | 56 |
| 5.2.5.4 Lavagem com etanol 70%..... | 57 |
| 5.2.5 Protocolo aperfeiçoado obtido após os testes realizados nos itens anteriores..... | 59 |
| 5.3 Comparação entre a concentração de DNA obtido e o volume filtrado de amostras de água do mar..... | 60 |
| 5.4 Comparação das metodologias de extração de DNA..... | 61 |
| 5.5 Integridade do DNA - PCR 16S RNAr..... | 63 |
| 5.6 Avaliação dos efeitos dos métodos de extração de DNA na comunidade bacteriana por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)..... | 64 |
| 5.6.1 Amplificação do gene 16S RNAr..... | 67 |
| 5.6.2 Análise do perfil do DGGE gerado pelas diferentes metodologias de extração..... | 69 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 78 |
| 6.1 Aperfeiçoamento de uma técnica para extrair DNA de água do mar..... | 78 |
| 6.2 Comparação entre diferentes métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha por DGGE..... | 78 |
| REFERÊNCIAS..... | 80 |
| ANEXO - Extração de DNA pelo método CTAB de Rivera et al., 2003..... | 92 |

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 71% da superfície do nosso planeta está coberta pelos oceanos. O Brasil, sendo um país de proporções continentais, possui o mais extenso litoral inter e subtropical do mundo, apresentando ecossistemas marinhos únicos e praticamente inexplorados (AB´SABER, 2005). É no ambiente marinho que se encontra o maior reservatório de organismos da Terra, sendo a grande maioria destes composta pelos mais antigos e mais abundantes organismos do planeta, as bactérias (COLWELL, 1997).

As bactérias são micro-organismos com imensa diversidade, rápido crescimento e variabilidade genética (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Sua presença é fundamental para o equilíbrio da vida no planeta, pois são os principais envolvidos nos ciclos biogeoquímicos, reciclando a matéria e fornecendo condições de vida para outros seres vivos (AZAM, 1998; MYERS, 1996). Economicamente, estão relacionadas com diversas áreas como agricultura, biolixiviação, produção de alimentos, compostos bioativos e no tratamento de áreas impactadas (biorremediação). Esse potencial biotecnológico dos micro-organismos proporciona um desenvolvimento econômico sustentável e, por isso, é importante estudá-los e preservá-los (COLWELL, 1997; HUNTER–CEVERA, 1998; RIVERA; PAULA; SOUZA, 2008).

Embora as bactérias apresentem essa infinidade de papéis, elas continuam sendo subexploradas. Isto porque, durante muito tempo, os estudos se concentraram apenas nos organismos cultiváveis, que representam cerca de 1% do total (COLWELL, 1997; TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Os avanços nas técnicas moleculares possibilitaram o estudo dos micro-organismos sem a necessidade de cultivá-los, e isso fez com que as pesquisas envolvendo a diversidade microbiana aumentassem nos últimos anos.

Dentre as técnicas moleculares para caracterizar os organismos estão os métodos de *fingerprinting*, tal como a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE). O DGGE, associado com a reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene 16S RNAr vem sendo utilizado para estudar a diversidade nos domínios Bacteria (THOMPSON, 2014) e Archaea (ZHANG, 2014).

Entretanto, o DGGE apresenta os vieses das técnicas que se baseiam no DNA para caracterizar os organismos e que podem levar a distintos resultados dependendo de como foi realizada a coleta e transporte das amostras, do protocolo escolhido para extração de DNA, das condições determinadas para realizar a reação em cadeia da polimerase e até mesmo das

análises dos dados, onde os pesquisadores utilizam seus *softwares* e critérios preferidos (INCEOGLU et al., 2010; OSBORNE et al., 2005).

Uma das maneiras para diminuir as variações nas análises da diversidade por métodos independentes de cultivo é utilizarmos o DNA representativo de toda a comunidade a ser estudada (INCEOGLU et al., 2010; TANG et al., 2009). No entanto, realizar a extração de DNA de origem ambiental é um desafio, pois há distintas características nos micro-organismos e nas amostras. Essa dificuldade é o principal motivo para o desenvolvimento de novas metodologias e *kits* comerciais de extração.

Assim, este estudo buscou fornecer uma nova opção para extrair DNA de água do mar, e comparar, por DGGE, o efeito de diferentes métodos de extração na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Aperfeiçoar a metodologia de extração de DNA total de água do mar descrita por Rivera et al. (2003), e, usando DNA extraído por diferentes metodologias, caracterizar a diversidade bacteriana marinha em uma amostra de água do Canal de São Sebastião-SP, pela técnica de DGGE.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Estabelecer um protocolo de extração de DNA de água do mar aprimorando as etapas da metodologia descrita por Rivera et al. (2003): processamento da amostra, lise celular, purificação e recuperação do DNA;
- ❖ Analisar pelo protocolo de extração estabelecido se a concentração de DNA obtido é proporcional ao volume de amostra de água do mar filtrada;
- ❖ Comparar as metodologias de extração: Rivera et al. (2003), Rivera et al. (2003) aperfeiçoado, Rivera et al. (2003) aperfeiçoado sem tRNA, *Kit comercial Power Water DNA* e *Kit comercial Power Soil DNA* quanto à concentração de DNA, razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} e tempo de execução;
- ❖ Comparar, por DGGE, o efeito de diferentes métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Diversidade microbiana marinha

Até onde sabemos, a vida e a sua diversidade são características exclusivas do nosso planeta e, apesar dos vários estudos para conhecer as espécies da Terra, a grande maioria permanece ainda sem descrição (MORA et al., 2011). Quando nos referimos aos micro-organismos, estima-se que menos de 1% do total existente é conhecido (COLWELL, 1997).

Aproximadamente 71% da superfície do nosso planeta está coberta pelos oceanos, sendo este, o maior habitat contíguo na Terra e que apresenta ecossistemas únicos e ricos em biodiversidade (HARPER; HAWKSWORTH, 1994). O ambiente marinho possui habitats que variam de alta luminosidade na superfície até a total escuridão nas profundezas oceânicas, com pressões que chegam até 110 Mpa e temperaturas que variam de 350 °C em fendas hidrotermais a -35 °C em mares congelados (QUERELLOU, 2010).

Em termos de biomassa, os procariotos representam 90% desse ambiente (SUTTLE, 2005), sendo que, somente na subsuperfície oceânica, existem aproximadamente $3,5 \times 10^{30}$ bactérias e, em mar aberto, a cada mililitro na coluna de água de 0 a 200 metros, encontramos 5×10^5 bactérias (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). O metabolismo destes organismos é extremamente variado, possibilitando que ocupem diversos nichos ecológicos e tornando-os fundamentais na sustentação dos ecossistemas, pois são peças chave nos ciclos de nutrientes e energia (STALEY; KONOPKA, 1985; SUTTLE, 2005).

O estudo da biodiversidade bacteriana é um dos mais desafiadores e fascinantes aspectos da microbiologia, uma vez que a diversidade das comunidades microbianas é o resultado de cerca de 4 bilhões de anos de mutações e eventos de recombinação que promoveram a especiação (WIEDENBECK; COHAN, 2011). Esta diversidade pode ser vista pelas variações no tamanho, morfologia, estratégias metabólicas, mecanismos de divisão celular, patogenicidade e adaptação aos ambientes (DANIEL; OGER; WINTER, 2006).

Por apresentar muitas características heterogêneas, considera-se que o genoma das bactérias é o maior reservatório de diversidade genética na Terra (FERRER et al., 2009; WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Após o surgimento da Terra, durante mais de 2 bilhões de anos, a vida e a evolução se restringiram apenas aos micro-organismos, sendo eles os responsáveis pelas mudanças das condições ambientais que possibilitaram o surgimento de novas ordens, famílias, gêneros e espécies (OVREAS; CURTIS, 2011). Desde então, são considerados os pilares da biosfera, pois realizam funções que nenhum outro organismo é capaz

como, por exemplo, a fixação de nitrogênio e nitrificação (AGOGUÉ et al., 2008; SWIFT et al., 1998). Portanto, os micro-organismos continuam sendo necessários para que a vida na Terra exista (HUNTER-CEVERA; KARL; BUCKLEY, 2005).

Os benefícios científicos já obtidos e os esperados a partir de um melhor conhecimento da biodiversidade de micro-organismos são enormes, podendo-se citar como exemplo a melhor compreensão das funções ecológicas realizadas nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre e nas interações com outros micro e macro-organismos (FINLAY; MABERLY; COOPER, 1997). Socioeconomicamente, esta diversidade está relacionada com o potencial para produção de novos antibióticos e agentes terapêuticos. Nos setores industriais, está envolvida na produção de enzimas, polímeros e alimentos, além da sua aplicabilidade nos processos de biorremediação e biolixiviação (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998).

Apesar do papel indiscutível dos micro-organismos marinhos no ecossistema global e da sua importância biotecnológica, o ambiente marinho continua subexplorado e, infelizmente, a exposição desse ecossistema à ação antrópica pode conduzir à extinção de insubstituíveis espécies. Portanto, é preciso o estudo descritivo dos organismos para que estes sejam usados de forma sustentável, mantendo a qualidade ambiental, segurança e saúde humana (RITTMANN et al., 2006).

3.2 Métodos de estudo da diversidade microbiana

3.2.1 Análise das comunidades microbianas utilizando o gene 16S RNAr

O isolamento de bactérias em meios de cultivo ainda é utilizado para estudar a diversidade de bactérias cultiváveis (LIU et al., 2012; ZHOU et al., 2013). Porém, mesmo sendo de suma importância, os métodos tradicionais não fornecem dados suficientes para analisar toda a diversidade microbiana (TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

Staley e Konopka (1985) verificaram que a grande maioria das células microbianas que podia ser vista com o uso do microscópio não era capaz de crescer e produzir colônias, fenômeno batizado como “a grande anomalia de placa”. Assim, estimaram que somente 0,1 a 1,0% das bactérias presentes no solo podiam ser cultivadas e em ambientes aquáticos esse número era 10 a 1000 vezes menor. Um estudo feito por Amann, Ludwig e Schleifer (1995), estimou que em água do mar, água doce, águas estuarinas, sedimentos e solos, somente 0,0001-0,1%, 0,25%, 0,1-3%, 0,25% e 0,3% das bactérias totais, respectivamente, podem ser cultivadas. Esse número tão pouco representativo é devido às dificuldades de reprodutibilidade

do habitat natural (EILERS et al., 2000) e porque inúmeras bactérias crescem apenas quando presente em um consórcio de micro-organismos (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010).

As limitações do método de cultivo em placa de bactérias dos ambientes naturais fizeram o estudo da diversidade microbiana uma tarefa difícil. Somente com o surgimento dos métodos independentes de cultivo é que foi possível fazer uma melhor avaliação da diversidade microbiana (PACE, 1997), sendo que para essa análise, a extração de ácidos nucleicos é fundamental, uma vez que está relacionada diretamente ao DNA dos organismos (FEINSTEIN; SUL; BLACKWOOD, 2009).

Estudar as comunidades microbianas a partir do DNA total extraído diretamente de amostras de origem ambiental representou uma mudança de paradigma na ecologia microbiana, pois permitiu que muitos ambientes pudessem ser caracterizados. No campo da filogenia, que tem como objetivo esquematizar as relações evolutivas dos organismos, os primeiros estudos avaliaram as sequências do gene 5S do ribossomo microbiano (STAHL et al., 1984). Entretanto, foi a subunidade 16S ribossomal que revolucionou o modo como os ecologistas microbianos passaram a entender o mundo das bactérias e arqueias, e é o gene 16S RNAr que vem sendo utilizado nos estudos filogenéticos (ALLERS et al., 2013; CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013; ZHAO et al., 2012).

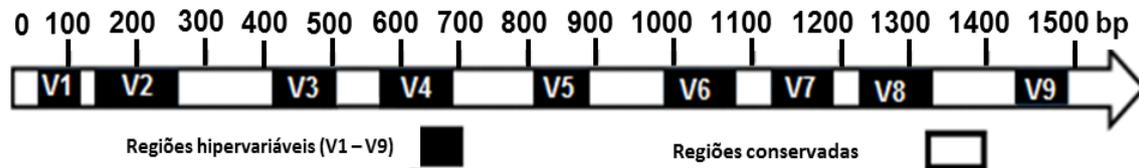
O estudo de ecologia bacteriana por métodos independentes de cultivo utilizam *primers* universais para amplificar o gene 16S RNAr de organismos presente em uma comunidade. Estes *primers*, teoricamente, são capazes de se anelar em todos os genes 16S RNAr presente na amostra para que ocorra a amplificação pela reação em cadeia da polimerase. Esta etapa inicial de amplificação é necessária para caracterizar os micro-organismos utilizando as técnicas independentes de cultivo, tais como clonagem (DAN et al., 2014), DGGE (HARDOIM et al., 2009), pirosequenciamento (DRAGO et al., 2012) e pelas plataformas de sequenciamento Illumina (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) (ARAVINDRAJA et al., 2013).

O gene RNAr é o mais escolhido no estudo da ecologia microbiana pois apresenta características que o tornam um cronômetro evolutivo: (i) é encontrado em todos os organismos, (ii) possui estrutura e função definida, (iii) está presente em grandes quantidades na célula (iv) mantém-se estável durante o tempo, (v) tem uma região em que é possível ocorrer mutações sem alterar sua estrutura e função (OLSEN et al., 1986). Nenhum outro marcador molecular tem tão baixa taxa de recombinação e de transferência horizontal e tamanha distinção entre os organismos quanto os genes RNAr (SCHLOSS; GEVERS; WESTCOTT, 2011).

Das subunidades ribossomais bacterianas, a 16S RNAr possui tamanho de 1.542 nucleotídeos com regiões hipervariáveis numeradas de V1 a V9 (Figura 1). É por meio destas

regiões que conseguimos classificar as bactérias filogeneticamente (NEEFS et al., 1990). O restante da molécula é extremamente estável, uma vez que as funções desempenhadas pelo ribossomo são essenciais e mutações em pontos chaves são eliminadas pela seleção natural.

Figura 1 – Regiões hipervariáveis e conservadas presente no gene 16S RNAr

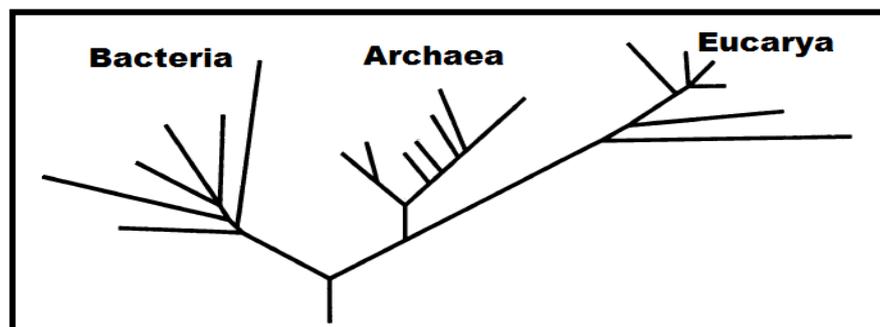


Fonte: Modificado de Cai, Archambault e Prescott (2003).

O conceito clássico de biodiversidade utiliza “espécie” como unidade de avaliação dos organismos. Entretanto, apesar do conceito de morfo-espécie já ter sido utilizado pelos microbiologistas (HAWKSWORTH, 1995), para as bactérias, na maior parte das vezes, não conseguimos aplica-lo, sendo fundamental o material genético e metodologias moleculares. Utilizando estas, podemos aplicar algoritmos matemáticos para separar os organismos de acordo com OTU (unidade taxonômica operacional) definidas (OVREAS; CURTIS, 2011).

Foi através das OTUs definidas, a partir do sequenciamento do RNA ribossômico, que foram estabelecidas as novas relações evolutivas para os organismos, deixando de existir os cinco reinos (Monera, Protista, Fungi, Plantae e Animalia) e fazendo a divisão filogenética dos organismos em três grandes domínios: Bacteria, Archaea e Eucarya. O objetivo da filogenia molecular é estabelecer um quadro em que os organismos são agrupados de acordo com sua evolução e estão todos geneticamente conectados. Na figura 2, o grupo das Bacteria, logo na raiz da árvore, se separa dos outros dois grupos, ficando Archaea e Eucarya mais proximamente relacionadas entre si (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990).

Figura 2 – Árvore filogenética dos domínios Bacteria, Archaea e Eucarya

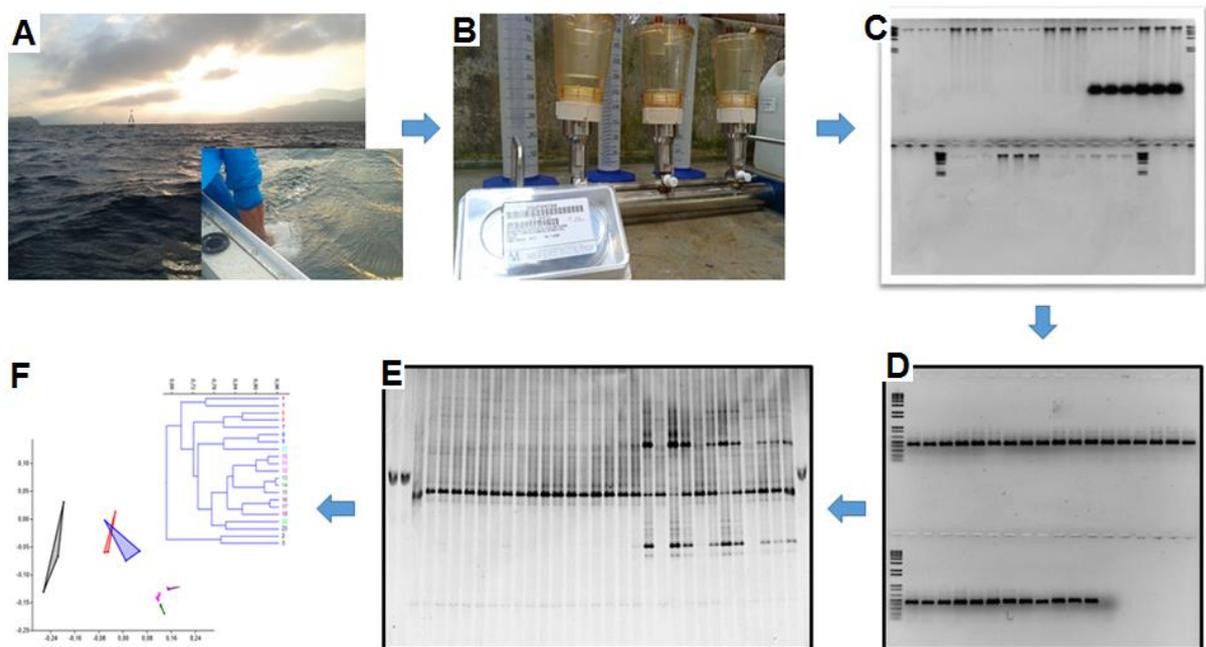


Fonte: Modificado de Woese, Kandler e Wheelis (1990).

3.2.2 Caracterização da comunidade bacteriana por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

Técnicas de *fingerprinting* fornecem o perfil da diversidade genética dentro de uma comunidade, sendo possível caracterizar comunidades bacterianas sem a necessidade de cultivar os micro-organismos. O DGGE é uma dessas técnicas e para realizá-lo é necessário: i) extrair o DNA total dos organismos presente no ambiente; ii) utilizar este como *template* para amplificar os genes 16S RNAr; iii) separar os *amplicons* em um gel com gradiente desnaturante; iv) analisar as imagens com *softwares* específicos (Figura 3) (HEUER et al., 1997).

Figura 3 – Caracterização de comunidades bacterianas marinhas por DGGE



(A) Coleta da água do mar. (B) Processamento da amostra para extração de DNA. (C) Gel de agarose da extração de DNA. (D) Gel de agarose da PCR do gene 16S RNAr. (E) DGGE da PCR do gene 16S RNAr. (F) Análises das imagens do DGGE por *softwares* específicos.

O fundamento da técnica está nas pontes de hidrogênio presentes entre as bases nitrogenadas do DNA e na mobilidade diferenciada do DNA de acordo com sua conformação. As pontes de hidrogênio são responsáveis pela estabilidade da dupla fita do DNA, porém, estas ligações podem ser desfeitas e, conforme isso ocorre, as duas fitas que compõe o DNA vão se separando até que ocorra a total desnaturação. A eletroforese em gel com gradiente desnaturante, como o próprio nome diz, é um gel de poliacrilamida composto por gradiente desnaturante crescente (geralmente ureia e formamida) e, à medida que o DNA vai percorrendo-

o, a fita dupla começa a se desnaturar, fazendo com que o DNA se mova mais devagar no gel (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

Assim, moléculas de DNA com tamanho idêntico poderão ser separadas no DGGE de acordo com suas propriedades de *melting*, ou seja, dependendo da facilidade de se desnaturarem frente ao gradiente desnaturante, característica esta que varia de acordo com a composição de bases nitrogenadas na molécula de DNA (FISCHER; LERMAN, 1979). O resultado do DGGE pode ser visto na Figura 3E, onde existe um padrão de bandas que reflete as características de *melting* dos *amplicons*.

Para obter um perfil confiável do DGGE, a molécula de DNA não pode se desnaturar completamente. Caso isso ocorra, o DNA continua correndo normalmente no gel na forma de fita simples. Para que isso seja evitado, na reação da PCR é utilizado um oligonucleotídeo iniciador com um grampo de CG (citosina-guanina) de aproximadamente 40 pares de bases (pb). Isso faz com que todos os *amplicons* adquiram o grampo CG e, conseqüentemente, um maior número de pontes de hidrogênio, dificultando a completa separação das fitas de DNA (MYERS et al., 1985).

Atualmente, o estudo da diversidade microbiana pode ser realizado utilizando-se as novas e eficazes plataformas de sequenciamento, como por exemplo, Pirosequenciamento 454 (Roche Diagnostics, Brandfor, CT, USA), Miseq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) e Ion Torrent (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (ZHOU et al., 2015). No entanto, DGGE continua sendo uma importante ferramenta e vem sendo utilizado para: 1) analisar comunidades (CHEN et al., 2014; LEKUNBERRI et al., 2014), 2) monitorar mudanças populacionais (WINKLER et al., 2013), 3) determinar vieses relacionados com a PCR (DÍEZ-VIVES; GASOL; ACINAS, 2012) e 4) comparar métodos de extração de DNA (INCEOGLU et al., 2010). O DGGE possui alto grau de resolução, chegando a ser capaz de separar *amplicons* de DNA que tenham, apenas, uma base de diferença (MYERS et al., 1985). Além disso, a técnica permite trabalhar com diversas amostras ao mesmo tempo e possui baixo custo.

Muyzer, De Waal e Uitterlinden (1993), foram os pesquisadores que utilizaram o DGGE primeiramente na ecologia microbiana e hoje, mais de vinte anos depois, a técnica continua sendo utilizada. No Brasil, encontramos trabalhos que avaliaram, com esta metodologia, a comunidade microbiana (leveduras e bactérias) de rio (RODRIGUES et al., 2013), comunidade bacteriana de amostras de petróleo (OLIVEIRA et al., 2008) e de cisternas de regiões do semiárido (ALVES et al., 2014). No ambiente marinho brasileiro, o DGGE já foi utilizado para avaliar as bactérias associadas com esponjas (HARDOIM et al., 2009), para estudar arqueias

em ambientes contaminados (CLEMENTINO et al., 2007) e para avaliar a diversidade de bactérias no sedimento (MORAES, 2012) e coluna d'água (CURY et al, 2011).

3.2.2.1 Análises estatísticas de fingerprinting do DGGE

Após a realização do DGGE, utiliza-se *softwares* adequados para normalizar e transformar as imagens geradas em matrizes de presença/ausência de bandas. Uma banda no gel de DGGE se refere a uma sequência tipo ou filotipo (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). Como uma população se refere a um grupo de organismos da mesma espécie que estão presentes no mesmo ambiente, pode-se dizer que uma banda vista no gel na verdade não se refere a um único filotipo, mas no conjunto destes, formada por várias sequências tipo da mesma espécie. Portanto, a intensidade da banda é a frequência de ocorrência desta espécie na comunidade bacteriana (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

Com os dados da matriz, podem ser feitos agrupamentos hierárquicos, realizar análises por ordenação, como NMDS (*Non-Metric Multidimensional Scaling*) e calcular índices de riqueza e diversidade. Para as análises hierárquicas, utiliza-se os dados da matriz gerada pelo padrão de bandas e, utilizando coeficientes de similaridade ou dissimilaridade, as amostras são classificadas e apresentadas na forma de dendrograma. Em algumas análises são consideradas somente a presença/ ausência de bandas, como por exemplo, Jaccard, Dice e distância Euclidiana, outras levam em consideração também a intensidade da banda, como o coeficiente de correlação de Pearson e índice de Bray-Curtis.

Após determinado o coeficiente e utilizando o algoritmo de agrupamento por média não ponderada (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), é possível gerar um dendrograma que represente as relações genéticas entre as amostras ou uma NMDS, com objetivo de facilitar a leitura do padrão do DGGE utilizando pontos plotados dentro de um gráfico bi ou tridimensional.

Na leitura do dendrograma, as amostras mais similares são as que estão nas ramificações mais próximas quando originadas de um mesmo ramo. Na NMDS, a leitura é feita considerando-se a distância entre os pontos, sendo que nos mais próximos, as amostras apresentam maior similaridade entre si e, portanto, maior semelhança da estrutura da comunidade (FROMIN et al., 2002).

Para calcular a diversidade (Shannon e Wiener) e a riqueza (Chao), também é utilizada a imagem do perfil do DGGE. Para estimar a riqueza, considera-se cada banda no gel uma OTU e cada uma, um organismo, portanto, o número de bandas será a riqueza. No cálculo da

diversidade utilizamos dois componentes: o número total de espécies (riqueza) e a distribuição do número de indivíduos dessas espécies, a equitatividade (WALKER, 1989).

3.3 Extração de DNA total: um viés no estudo da diversidade microbiana

Quando nos referimos a “metagenoma” significa que estamos abordando um *poll* de genomas de uma determinada amostra (ROUX et al., 2014). Os métodos de extração de DNA total de amostras de origem ambiental visam extrair o DNA de todos os organismos presentes. Mas, apesar das técnicas seguirem certas diretrizes, elas não terão a mesma eficiência para todos os tipos de amostra, ou seja, as particularidades da extração dependerá se a amostra é proveniente de solo, água doce, água do mar, sedimento, rochas e assim por diante. (BOSTRÖM et al., 2004; LEFF et al., 1995; MILLER et al., 1999; ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Embora, as técnicas moleculares tenham revolucionado a maneira de estudarmos a diversidade microbiana, o método de extração de DNA ainda é um fator que limita as pesquisas (FEINSTEIN; SUL; BLACKWOOD, 2009; MILLER et al. 1999). A princípio, a análise do DNA total extraído diretamente do ambiente fornecerá informações de todos os membros presentes na comunidade. No entanto, estudando uma mesma amostra, diferentes resultados podem ser obtidos, vai depender do método escolhido para realizar a extração e das estratégias adotadas por este. Isso acontece porque a microbiota ambiental é diversa e nem todos os métodos de extração terão a mesma eficiência (ARIEFDJOHAN; SAVAIANO; NAKATSU, 2010).

Já foi observado que estudos da diversidade microbiana são estritamente dependente da concentração de DNA (ARIEFDJOHAN; SAVAIANO; NAKATSU, 2010) e que, quanto maior o rendimento, maiores são as chances de se encontrar membros raros (SCUPHAM; JONES; WESLEY, 2007). No entanto, outros estudos não confirmam estas conclusões (GARBOR; VRIES; JANSSEN, 2003; STACH et al., 2001).

Inceoglu et al. (2010), estudando bactérias de solo, observaram no DGGE e em biblioteca de clones que, usando três métodos de extração de DNA total de solo, os resultados de diversidade e estrutura da comunidade foram significativamente afetados, ou seja, cada método de extração resultou em uma diversidade de bactérias em um mesmo local.

Resultados semelhantes também já foram vistos com amostras de água. Tang et al. (2009), filtraram 5 litros de água de um lago e usaram quatro métodos para extrair o DNA total

da amostra. Ao realizarem DGGE com o DNA extraído, concluíram que os diferentes métodos de extração influenciavam no perfil gerado.

Recentemente foi usada a técnica do pirosequenciamento para avaliar a composição da comunidade bacteriana do rúmem de bovino e caprino utilizando amostras obtidas por diferentes técnicas de extração de DNA. Este trabalho, feito por Henderson et al. (2013), chegou na mesma conclusão que os demais trabalhos, ou seja, a escolha do método de extração gera distintos resultados em relação a estrutura da comunidade microbiana.

3.3.1 Métodos de extração de DNA de água

A extração de DNA total de amostras de água é um passo fundamental para a realização de análises moleculares em amostras de origem ambiental. O DNA precisa ter rendimento e qualidade suficientes, pois estas são características cruciais na realização dos estudos, que podem ter por objetivo desde a procura de um determinado gene no ambiente, até complexas caracterizações metagenômicas usando técnicas de sequenciamento de alto rendimento.

Dessa forma, inúmeros métodos foram desenvolvidos e estão disponíveis para a extração de DNA de amostras de água (FRIAS-LOPEZ et al., 2008; FUHRMAN et al., 1988; GANESH et al., 2013; MOESENEDER et al., 1999; RIVERA et al., 2003; SOMERVILLE et al., 1989). Estes métodos concentram as bactérias presentes em amostras de água usando filtros, utilizam detergentes e/ou sistemas mecânicos para romper as células, purificam o DNA com fenol e, finalmente, precipitam-o. Embora os métodos tenham certas variações, eles seguem as seguintes diretrizes:

i) Processamento da amostra de água

Não existe uma quantidade padronizada de água para realizar as extrações de DNA e, dependendo do volume utilizado, a metodologia escolhida para filtrar a amostra pode facilitar o trabalho. Quando grandes volumes (500 mL ou mais) são utilizados, as células podem ser coletadas por uma membrana acoplada em um suporte e utilizando uma bomba a vácuo (FUHRMAN et al., 1988; QIAN et al., 2011). No entanto, para coletar células de volumes menores que 500 mL, os aparelhos para filtração não são necessários, podendo-se usar cartuchos especiais como o *sterivex* (SOMERVILLE et al., 1989; URAKAWA; MARTENS-HABBENA; STAHL, 2010).

Inúmeras são as particularidades que podem existir em corpos de água e a extração de DNA total de água são influenciadas por estas características. Dessa forma, algumas etapas no

processamento da amostra são necessárias para garantir a reprodutibilidade da metodologia de extração. Em amostras de água do mar, por exemplo, é aconselhável lavar a membrana com água de diluição para retirar os sais que estão em excesso (RIVERA et al., 2003).

ii) Lise das células presentes na amostra

A lise celular é um passo crítico em qualquer extração de DNA e podemos realizá-la utilizando métodos enzimáticos (lisozima e proteinase K), químicos (SDS) e físicos (*bead-beating*, sonicação e choque térmico), estes últimos costumam ser mais efetivos e menos seletivos do que os demais (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008).

Devido ao número de ferramentas de lise celular, alguns autores utilizam técnicas combinadas para garantir a quebra de um maior número de células e, conseqüentemente, aumentar a concentração de DNA (GARBOR; VRIES; JANSSEN, 2003; MORÉ et al., 1994).

iii) Tratamento adicional à lise celular e purificação do DNA

O CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) é um detergente que frequentemente é utilizado em extrações de DNA. Ele auxilia na liberação dos componentes celulares promovendo a solubilização das membranas celulares e atuando na separação dos ácidos nucléicos de polissacarídeos e compostos húmicos. Estes compostos possuem solubilidade diferenciada na presença do CTAB, assim, o DNA forma um complexo com este detergente que facilita sua posterior purificação (OLIVEIRA et al., 2007; ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

iv) Purificação do DNA

O método mais utilizado para separar o DNA das proteínas presentes na amostra é utilizando fenol tamponado. Esta solução causa desnaturação das proteínas, permitindo sua posterior separação por centrifugação. Assim como o fenol, o clorofórmio também pode ser usado para desnaturar as proteínas. Dessa forma, quando estas duas soluções estão juntas, a desproteinização se torna mais eficiente do que quando as soluções são usadas separadamente (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e, por isso, muitos trabalhos utilizam esta mistura orgânica para purificar o DNA (AHMAD et al., 2004; URAKAWA; MARTENS-HABBENA; STAHL, 2010; WAHLBERG et al., 2012).

Quando o fenol:clorofórmio é adicionado na amostra, as proteínas desnaturam e formam uma camada na interface da fase orgânica e fase aquosa. É extremamente importante que o pH esteja entre 7,8-8,0 para o DNA permanecer na fase aquosa, pois em pH menor que 7,8 o DNA

pode ir para a interface, chegando a ir para a fase orgânica quando o pH está menor que 7,0 (OLIVEIRA et al., 2007; SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Como é necessário o uso de fenol tamponado, o ácido fênico é tratado com tampão 0,5M Tris-Cl (pH 8,0) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

v) Precipitação do DNA, lavagem e eluição do DNA

Os reagentes mais utilizados para concentrar os ácidos nucleicos são: os alcoois, na presença de concentrações específicas de sais, como de acetato de amônio, acetato de sódio e cloreto de sódio. Quando estes compostos estão juntos, eles desidratam as moléculas de ácidos nucleicos, fazendo com que elas se agreguem. Assim, ficam mais compactas e, conseqüentemente, precipitam mais facilmente. Após a precipitação, realiza-se uma lavagem do *pellet* com etanol 70% para remover resíduos de sais e, para finalizar, o DNA é secado e eluído em tampão, como por exemplo, TE (pH 8,0) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Uma alternativa para os métodos de extração convencionais, que geralmente são trabalhosos, são os *kits* comerciais. Estes permitem uma maior reprodutibilidade da técnica de extração, além da rápida recuperação de DNA (WILLNER et al., 2012). Entretanto, alguns estudos já demonstraram que o rendimento de DNA recuperado por *kits* comerciais é mais baixo em comparação com os métodos tradicionais de extração (HURT et al, 2001; LEAR; DONG; LEWIS, 2010; MARTIN-LAURENT et al., 2001; TAPPEH; HANIFIAN; DIBA, 2012).

Embora, existam diversas metodologias para extrair o DNA total de amostras de água, uma coisa é certa: ele precisa ser representativo de toda a comunidade para o estudo não subestimar a diversidade dos organismos presentes no meio (SANZ; KÖCHLING, 2007). Assim, esse estudo buscou aprimorar uma metodologia convencional de extração de DNA de água do mar, de forma que, conseguisse agregar em uma só técnica qualidade, eficiência e rapidez. Além disso, para demonstrar a importância dos métodos de extração de DNA no estudo da diversidade microbiana marinha foi feita a caracterização de uma comunidade, por DGGE, utilizando DNA extraído por cinco metodologias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aperfeiçoamento da metodologia de extração de DNA de Rivera et al., 2003

4.1.1 Amostras utilizadas

Foi utilizada nessa etapa do estudo água do mar cedida gentilmente pelo Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade de São Paulo, provinda do Centro de Biologia Marinha (CEBImar) em São Sebastião – SP. Para cada teste do item 4.2 e para os testes do item 4.3 e 4.4 foi realizada uma coletada de água do mar no IO em frascos de 5 litros.

4.1.2 Processamento das amostras

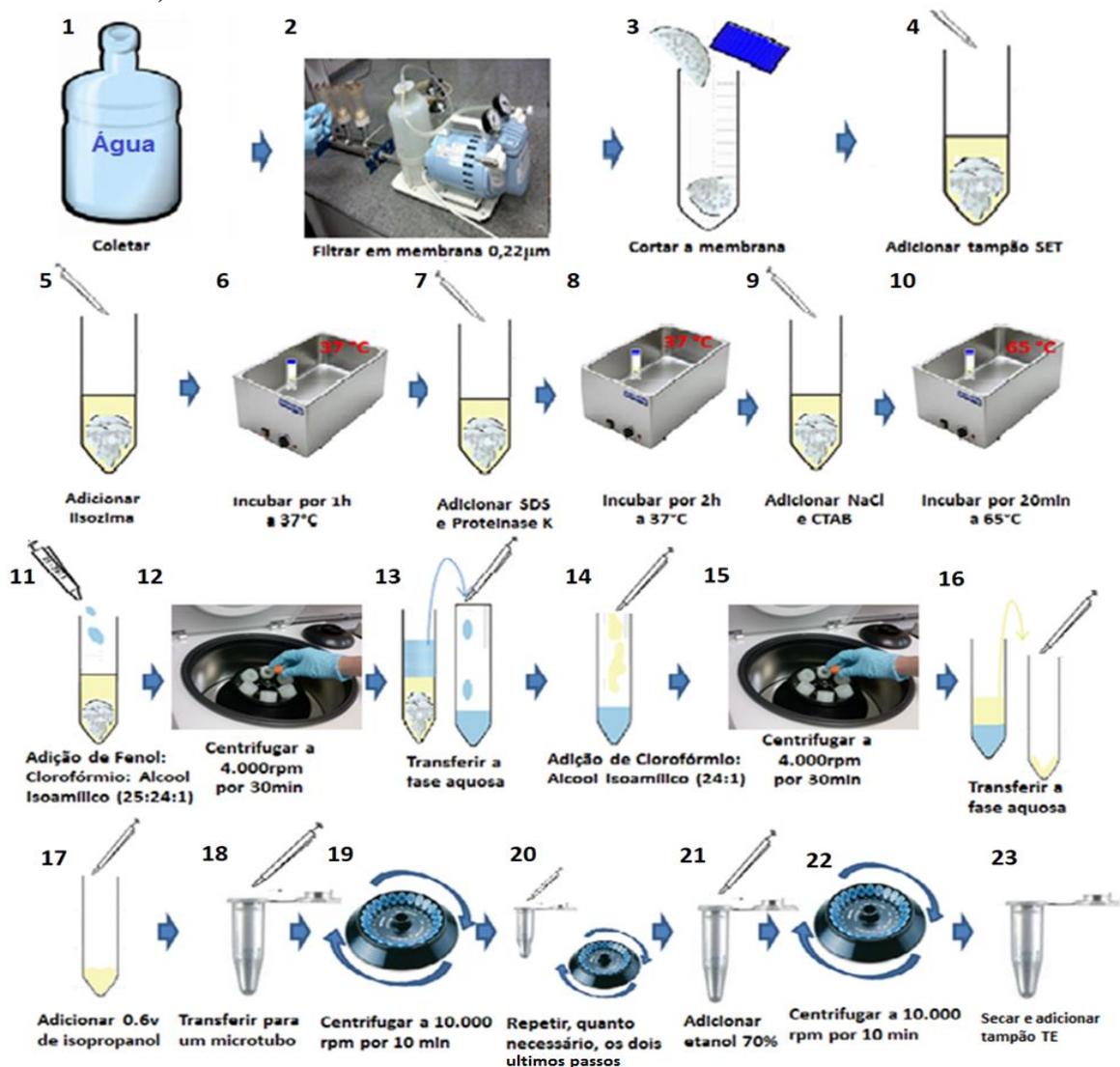
As amostras de água do mar foram homogeneizadas e 100 mL foram filtrados pela técnica da membrana filtrante, usando membranas de policarbonato de 0,22 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro (Millipore, Corp., São Paulo, SP, Brasil). Posteriormente, as membranas foram lavadas com 100 mL de água de diluição (Anexo i), para retirar o excesso de sal. Em seguida, cada membrana foi cortada assepticamente em pedaços pequenos e colocada em tubos Falcon (capacidade de 15 mL) e armazenadas à -20 °C até o momento da extração.

4.1.3 Técnica de extração de DNA - Rivera et al., 2003

Aos tubos com as membranas, foram adicionados 1,8 mL de tampão SET (Anexo ii) e 360 µL de solução de lisozima (5 mg.mL⁻¹) (Anexo iii) e, então, os tubos foram incubados a 37 °C por 1 hora, em banho-maria, sob agitação manual a cada 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 115 µL de solução de SDS 10% (Anexo iv) e 25 µL de proteinase K (20 mg.mL⁻¹) (Anexo v) com nova incubação a 37 °C por 2 horas com agitação manual a cada 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 400 µL de NaCl 5 M (Anexo vi) e 280 µL de solução 10% CTAB (Anexo vii) pré-aquecida a 65 °C e os tubos foram incubados por 20 minutos a 65 °C com agitação manual a cada 5 minutos. Aos tubos de extração, adicionou-se igual volume (~ 3 mL) da mistura de F: C: A (25:24:1). Posteriormente, eles foram homogeneizados gentilmente e centrifugados (Centrifuga 5418R – Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 4.000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente para separação das fases orgânica e aquosa. A fase aquosa foi transferida para outro tubo Falcon e adicionou-se igual volume da mistura C: A (24:1). Os tubos

foram homogeneizados gentilmente e centrifugados a 4.000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon e para a precipitação do DNA foi adicionado 0,6 volume de isopropanol. Essa mistura foi parcialmente transferida para um microtubo e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, verteu-se completamente o tubo para descarte do sobrenadante. Esses dois últimos passos foram repetidos até que toda a solução tivesse sido centrifugada. Para finalizar, adicionou 500 μ L de etanol 70% gelado e centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos. Então, verteu-se completamente o tubo para descarte do sobrenadante e os tubos foram colocados para secar no dessecador a vácuo. Após a secagem, o DNA foi suspenso em 30 μ L de tampão TE (pH 8,0) (Anexo viii) e estocado a 4 °C (Figura 4).

Figura 4 – Metodologia de extração de DNA total água do mar de acordo com Rivera et al., 2003



Nota: Os passos da extração de DNA de água do mar estão numerados de 1 a 23.

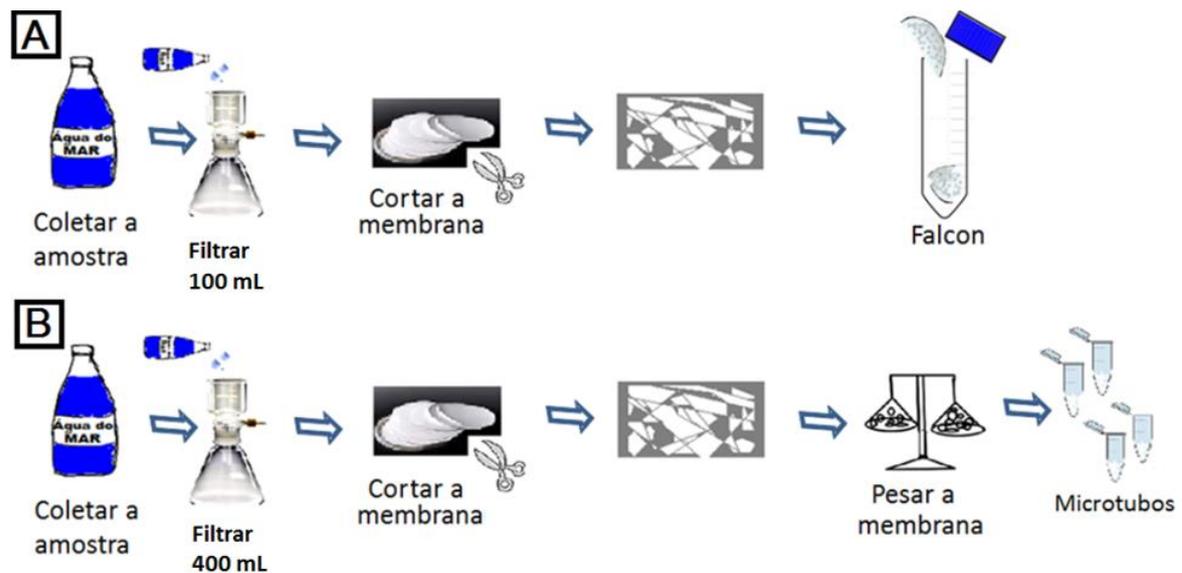
4.2 Etapas para aperfeiçoamento da técnica de extração de DNA – Rivera et al., 2003

Os testes visaram aprimorar as etapas da extração de DNA de Rivera et al., 2003: processamento da amostra, lise celular, purificação e recuperação do DNA. Conforme os testes foram sendo realizados, as alternativas que resultaram em uma melhor qualidade de DNA, maior concentração e em um menor tempo foram selecionadas para o protocolo aperfeiçoado. Portanto, um novo protocolo foi sendo desenvolvido no decorrer dos experimentos. Em quadruplicata as seguintes modificações foram testadas:

4.2.1 Processamento (passos 1, 2 e 3): Ensaio para substituir os tubos Falcon (15 mL) por microtubos (tubos de polipropileno, 2,0 mL)

Em quadruplicata, foram filtrados 100 mL e realizadas extrações nos tubos Falcon como descrito no item 4.1.3. Em paralelo, outras amostras foram preparadas para serem usadas nos microtubos. Assim, filtrou-se 400 mL da mesma amostra de água, em uma única membrana e, em seguida, esta foi cortada assepticamente, pesada e igualmente distribuída em quatro microtubos (quadruplicata). Portanto, cada microtubo continha aproximadamente 100 mL de água filtrada (Figura 5). Na extração realizada nos microtubos utilizou-se $\frac{1}{4}$ do volume dos reagentes utilizados na extração com os tubos Falcon (Tabela 1).

Figura 5 – Processamento das membranas



(A) Etapa de processamento da amostra utilizado no protocolo de Rivera et al. (2003) (tubos Falcon). (B) Etapa de processamento da amostra utilizado no protocolo aperfeiçoado (microtubos).

Tabela 1 - Quantidades de reagentes utilizados nas extrações feitas com os tubos Falcon e com os microtubos

| REAGENTES | FALCON | MICROTUBOS |
|--|-------------------|-------------------|
| Tampão SET | 1.800 µL | 450 µL |
| Lisozima (5 mg.mL ⁻¹) | 360 µL | 90 µL |
| SDS 10% | 115 µL | 28,75 µL |
| Proteinase K (20 mg.mL ⁻¹) | 25 µL | 6,25 µL |
| NaCL 5 M | 400 µL | 100 µL |
| CTAB 10% | 280 µL | 70 µL |
| F: C: A | ~ 3000 µL | ~745 µL |
| C: A | 1 vol. do total | 1 vol. do total |
| Isopropanol | 0,6 vol. do total | 0,6 vol. do total |

4.2.2 Lise (passo 5): adição de glass beads

Para o teste de ação de *glass beads*, foi adicionado, juntamente com a lisozima, 1,3 g de *glass beads*, com diâmetros de 150 a 212 µm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o efeito na concentração final de DNA dessa adição foi comparado com o controle (extração sem *beads*).

No protocolo de Rivera et al. (2003), as amostras são incubadas a 37 °C por 1 hora, em banho-maria, sob agitação manual a cada 10 minutos. Como as *beads* foram adicionadas, a cada 10 minutos as amostras foram agitadas no vortex por 1 minuto na sua velocidade máxima.

4.2.3 Lise (passo 5): concentração de lisozima

No ensaio envolvendo a lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram testadas as concentrações finais: Zero, 0,25 mg.mL⁻¹, 0,5 mg.mL⁻¹, 1,0 mg.mL⁻¹, 1,5 mg.mL⁻¹, 2,0 mg.mL⁻¹ e 4,0 mg.mL⁻¹.

4.2.4 Lise (passos 7 e 8): concentração e tempo de ação de proteinase K

Para o teste da ação de proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), foram testadas as seguintes concentrações finais: Zero, 25 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 150 µg.mL⁻¹, 200 µg.mL⁻¹, 300 µg.mL⁻¹ e 400 µg.mL⁻¹.

Após encontrarmos a melhor concentração de proteinase K, foram testados os seguintes tempos de ação: 30min, 1h, 2h e *overnight* (18 h). Durante o período *overnight*, as amostras não foram agitadas.

4.2.5 Tratamento adicional à lise celular e purificação (passos 9 e 10): concentração final e tempo de ação do CTAB

Para o teste de ação do CTAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), foram testadas as seguintes concentrações da solução: 0%, 1%, 2% e 3%. Da mesma forma como foi feito para a proteinase K, após encontrarmos a melhor concentração do detergente CTAB, foram testados com esta os tempos de ação: 5min, 20min, 40min e 1h.

4.2.6 Purificação (passos 11 e 12): velocidade de centrifugação e intervalo de tempo com F: C: A

Após a adição de F: C: A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA e Merck, Darmstadt, Alemanha respectivamente), as amostras foram homogeneizadas gentilmente e centrifugadas por 2 minutos a 10.000 x g. Em paralelo, em quadruplicata, outras amostras seguiram a extração de DNA conforme o protocolo original (30 minutos a 4.000 rpm).

4.2.7 Purificação (passos 14 e 15): velocidade de centrifugação e intervalo de tempo com C:A

Após a adição de C: A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA e Merck, Darmstadt, Alemanha respectivamente), as amostras foram homogeneizadas gentilmente e centrifugadas por 2 minutos a 10.000 x g. Em paralelo, em quadruplicata, outras amostras seguiram a extração de DNA conforme o protocolo original (30 minutos a 4.000 rpm).

4.2.8 Recuperação (passo 17): concentração do agente coprecipitador (Baker's yeast tRNA)

Juntamente com o agente precipitador (isopropanol), foi adicionado um coprecipitador (tRNA) (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). As seguintes concentrações finais de tRNA foram testadas: 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Também foi extraído DNA de uma amostra sem adição do coprecipitador tRNA.

4.2.9 Recuperação (passos 17): agentes precipitadores

Para recuperar o DNA, as seguintes condições foram testadas: 1) Adição de 0,6 v de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), 2) Adição de 0,6 v de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha), 3) Adição de 0,6 v de isopropanol + tRNA na concentração final de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 4) Adição de 0,6 v de etanol absoluto + tRNA na concentração final de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.2.10 Recuperação (passos 19 e 20): tempo e velocidade de centrifugação para recuperar o DNA

Após adição do agente precipitador, sem adicionar o tRNA, as amostras foram testadas quanto a velocidade e tempo de centrifugação. As seguintes condições foram avaliadas: 10.000 x g por 10 minutos, 10.000 x g por 20 minutos, 16.900 x g por 10 minutos e 16.900 x g por 20 minutos.

4.2.11 Purificação do sal residual (passo 22): tempo de lavagem do DNA com etanol 70%

Após o DNA ter sido precipitado, foram testados alguns intervalos de tempo para lavá-lo com etanol 70% gelado (Merck, Darmstadt, Alemanha). Utilizando centrifugação a 10.000 x g, foram avaliados os tempos de 2 min, 5 min e 10 min. Também foi avaliado se a lavagem realmente era necessária, assim, foi realizada, em quadruplicata, a extração sem esta etapa. O tRNA não foi utilizado nesse teste.

4.3 Teste de concentração de DNA recuperado por volume de água filtrada

Em quadruplicata, o protocolo aperfeiçoado foi testado quanto a sua eficiência para os volumes (25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL). Como controle negativo da metodologia, foi realizado o protocolo de extração para membranas que não passaram por filtração (membranas estéreis). Não foi utilizado o tRNA nesse experimento.

4.4 Comparação de metodologias de extração de DNA total de água do mar

Com um volume de 100 mL de água do mar filtrada, os protocolos de extração de Rivera et al. (2003), Rivera et al. (2003) aperfeiçoado, Rivera et al. (2003) aperfeiçoado sem tRNA,

Kit comercial *Power Water DNA* (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) e *Kit* comercial *Power Soil DNA* (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) foram comparados quanto a concentração de DNA obtida, razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ e tempo de execução.

Os *kits* foram utilizados conforme instruções do fabricante. No entanto, como o fabricante recomenda na última etapa eluir as amostras em 100 μL , nós tivemos que adicionar mais uma etapa na metodologia. Assim, os DNA, extraídos pelos *kits*, foram para o concentrador 5301 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e em seguida, eluídos em 30 μL de TE, mesmo volume das outras metodologias.

4.5 Análise comparativa dos métodos de extração

4.5.1 Análise qualitativa e quantitativa das amostras de DNA de água de mar

O DNA de cada amostra foi analisado de duas maneiras. A primeira, visualmente, observando a integridade do DNA e comparando suas concentrações através de eletroforese. Assim, aplicou-se 5 μL dos DNA extraídos em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X juntamente com 5 μL do marcador de tamanho molecular (DNA do fago λ digerido com *Hind* III) (Promega, Madison, WI, USA). A segunda, pela quantificação da concentração do DNA em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), pela leitura de absorvância da luz ultravioleta no comprimento de onda 260 nm (Concentração do DNA em $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1} = A_{260} \times 50$) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e nos comprimentos 230 e 280 nm, para calcular as razões $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$ e avaliar a qualidade do DNA.

4.5.2 Avaliação da integridade do DNA usando a amplificação do gene 16S RNAr

O DNA também foi avaliado pela reação de amplificação do gene 16S RNAr utilizando os iniciadores 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') (LANE, 1991) e 1401R (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3') (NUBEL et al., 1996). Esta foi realizada em um volume final de 50 μL , sendo 5,0 μL de solução tampão 10X (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 2,0 μL de MgCl_2 a 50 mM (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,25 μL de solução *mix* de dNTPs a 10 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,75 μL da solução de cada iniciador a 20 μM (Invitrogen, Pleasanton, CA, USA), 0,4 μL da enzima *Taq* polimerase (5U/ μL) (Invitrogen, São

Paulo, SP, Brasil), 39,85 μL de água ultra pura e 1,0 μL de DNA (5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). No controle negativo da reação de PCR não foi adicionado DNA.

A amplificação foi feita em termociclador (Mastercycler ep Gradient S – Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguindo-se de 20 ciclos de amplificação (94 °C por 1 min / 55 °C por 1 min / 72 °C por 3 min) e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

O fragmento de DNA amplificado (2 μL) foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, juntamente com 5 μL do marcador de tamanho molecular (DNA do fago λ digerido com *Hind* III). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 10 minutos e foi fotografado em fotodocumentador modelo GEL DOC XR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.5.3 Análises estatística: Teste *t* pareado

Para confirmar as diferenças ou semelhança entre os experimentos do item 4.2 e 4.4, foi aplicado o teste *t* pareado usando o Excel 2010 (Microsoft Office, Redmond, WA, USA). Este teste é usado quando a mesma amostra é avaliada por diferentes métodos observando um único parâmetro. No caso deste trabalho, supomos que em cada teste de otimização estávamos trabalhando com a mesma amostra, pois filtramos o mesmo volume da mesma água em cada membrana.

Com este teste podemos avaliar pelos parâmetros mensurados: concentração de DNA, razão $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$, se existem diferenças significativas entre os ensaios realizados. Nos estudos feitos por Steffan et al. (1988), e Rogers et al. (2007), o teste *t* pareado foi utilizado para comparar os rendimentos de DNA, utilizando diferentes metodologias de extração.

As informações necessárias para realizar este teste são: média das diferenças entre as amostras, o desvio padrão das diferenças e o número de pares das amostras. Assim, considera-se a hipótese nula de que a diferença média entre os grupos é zero, então calcula-se o valor de *t* ($t_{\text{calculado}}$). Comparando o $t_{\text{calculado}}$ com *t* fornecido por tabelas estatísticas ($t_{\text{crítico}}$) é possível concluir se existe ou não diferença entre os grupos. Para esta pesquisa consideramos o valor do $t_{\text{crítico}}$ sendo 3,182, dado pelo grau de liberdade 3 ($n-1$) com confiança de 95% (α).

Com o objetivo de sintetizar os resultados de hipótese, podemos representar como valor *p* a probabilidade de obter o efeito observado. Assim, quando o $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o $t_{\text{crítico}}$ aceitou-se a hipótese nula (Quadro 1 - A), ou seja, $P > 0,05$, por outro lado, rejeita-se a hipótese nula nos $t_{\text{calculado}}$ maiores que o $t_{\text{crítico}}$ (Quadro 1 - B), ou seja, $P < 0,05$.

Quadro 1 – Fórmulas para as análises do teste *t* pareado

| | |
|---|---|
| $t = \frac{ \bar{d} - \Delta }{s_d / \sqrt{n}} < t_{n-1, \alpha}$ | $t = \frac{ \bar{d} - \Delta }{s_d / \sqrt{n}} > t_{n-1, \alpha}$ |
| A | B |

Nota: \bar{d} = média das diferenças. $\Delta = 0$ (hipótese nula). s_d = desvio padrão das diferenças. N = número de pares das amostras. α = porcentagem de confiança.

Fonte: Modificado de Barros-Neto, Scarminio e Bruns (2007).

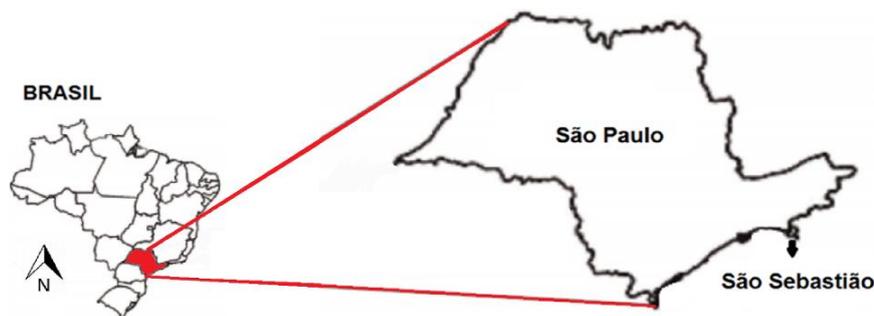
4.6 Comparação de métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

4.6.1 Coleta da amostra de água do mar

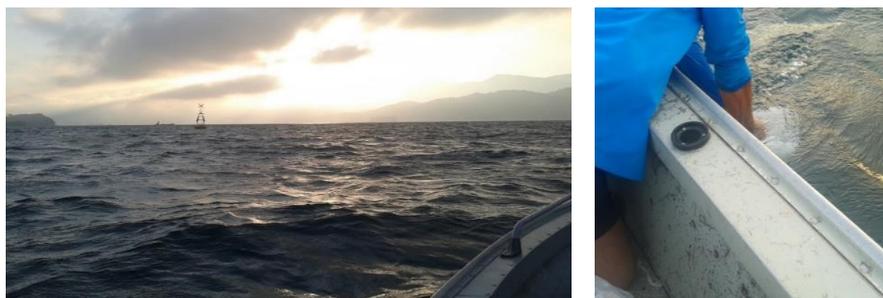
Foram coletados 20 L de água do mar em um frasco de polipropileno, previamente esterilizado. A amostra foi coletada a 10 cm da superfície, antes do nascer do sol, no mês de abril de 2014. O local escolhido (Lat 23°49'50"S, Long 45°25'20"W) fica em São Sebastião em frente à praia do Segredo no Estado de São Paulo, Brasil (Figura 6).

Figura 6 – Local de coleta da amostra de água do mar

A.



B.



(A) Localização da área de estudo (B) Coleta da amostra

4.6.2 Processamento das amostras coletadas

Imediatamente após a coleta, a amostra foi processada. Para coletar os micro-organismos, a amostra de água do mar foi homogeneizada no frasco de coleta e os volumes de 400 mL e 1600 mL foram filtrados, 5 vezes cada um, pela técnica da membrana filtrante citada no item 4.1.2. A cada 400 mL filtrados, filtrávamos 200 mL de água de diluição.

Após a filtração, colocamos as membranas em tubos Falcon e estes foram transportados, sob refrigeração, para o Laboratório de Microbiologia Ambiental/ICB II/USP. Em seguida, cada membrana foi individualmente cortada assepticamente, pesada e igualmente distribuída em quatro microtubos. Portanto, os microtubos que estavam com os pedaços de membranas nas quais filtramos o volume de 400 mL continham aproximadamente 100 mL de água filtrada e os microtubos que estavam com os pedaços de membranas nas quais filtramos 1600 mL continham aproximadamente 400 mL de água filtrada.

4.6.3 Métodos de extração de DNA da água do mar

Após o processamento, extraímos o DNA dos micro-organismos presente na água do mar utilizando 5 métodos:

i) CTAB aperfeiçoado com lizozima e sem tRNA (C+L-T)

Este método é o protocolo de Rivera et al. (2003) que foi aperfeiçoado neste estudo com as seguintes modificações: i) inserção de 90 μL de solução de lizozima (5 mg.mL^{-1}) juntamente com tampão SET e, então, as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora, em banho-maria, sob agitação manual a cada 10 minutos. ii) retirada do tRNA.

ii) CTAB aperfeiçoado sem tRNA (C-T)

Este método é o protocolo de Rivera et al. (2003) que foi aperfeiçoado neste estudo sem a presença do coprecipitador tRNA.

iii) CTAB aperfeiçoado (C)

Este método é o protocolo de Rivera et al. (2003) que foi aperfeiçoado neste estudo e, assim como, com as demais metodologias, queremos comparar o perfil microbiano gerado pelo DGGE desta técnica, observando a reprodutibilidade e similaridade com os outros perfis.

iv) *Power Soil (PS)*

Este método é um *Kit* comercial para extração de DNA de solo. O *kit* foi utilizado conforme instruções do fabricante e em seguida o DNA obtido foi concentrado e eluído em 30 µl de TE

v) *Power Water (PW)*

Este método é um kit comercial indicado para extrair DNA de água. Utilizamos o *kit Power Water* conforme as instruções do fabricante e em seguida o DNA obtido foi concentrado e eluído em 30 µl de TE

4.6.4 Amplificação do gene 16S RNAr

A amplificação do gene 16S RNAr foi realizada com os primer 517F com grampo de guanina e citosina e o primer 907R (Tabela 2). A reação foi realizada em um volume final de 25 µL, sendo 2,5 µL de solução tampão 10X, 0,75 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,75 µL de solução *mix* de dNTPs a 2 mM, 0,75 µL da solução de cada iniciador a 10 µM (Exxtend, São Paulo, SP, Brasil), 0,1 µL da enzima *Taq* polimerase (5 U.µL⁻¹), 1,0 µL de DNA nas concentrações obtidas por cada metodologia de extração e 18,4 µL de água ultra pura. No controle negativo da reação de PCR não foi adicionado DNA.

Assim como realizado em trabalhos anteriores (DE LIPTHAY et al., 2004; MIRSEPASI et al., 2014), a quantidade de DNA utilizada neste estudo não foi padronizada, pois assim conseguiríamos o perfil do DGGE a partir do DNA obtido pelas diferentes metodologias e não a partir de uma possível normalização dos dados. Além disso, optamos por não normalizar os dados da concentração, pois não conseguiríamos fazer o mesmo com os valores das razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$.

A amplificação foi feita nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguindo-se de 30 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min; 52 °C por 45 seg; 72 °C por 1 min) e uma extensão final de 72 °C por 5 min. O fragmento de DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% como descrito anteriormente no item 4.5.2.

Tabela 2 - Primers utilizados na reação de PCR para o DGGE

| PRIMER | SEQUÊNCIA | REFERÊNCIA |
|-----------|---|---------------------------------------|
| 517F* | GCCAGCAGCCGCGGTAA | Muyzer, De Waal e Uitterlinden (1993) |
| 907R | CCGTCAATTCMTTTGAGTTT | |
| Grampo-GC | CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGG | |

Legenda: * Primer com o grampo GC

4.6.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

O DGGE foi realizado no equipamento *Ingeny PhorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda), na concentração de poliacrilamida (Acrilamida: Bis 37,5:1) 6% em tampão TAE 1x. Para o preparo do gradiente desnaturante de 45 a 65% foram utilizadas as soluções de 0 e 80% desnaturantes, sendo que 100% de desnaturação consiste na concentração de 7 M de ureia e 40% de formamida. Foram aplicados 10 µl do produto da PCR e esse foi submetido a eletroforese vertical por 16 h a 90 V à temperatura de 60 °C. Posteriormente, o gel foi corado, em abrigo de luz, por 30 min com SYBR-Green I (Molecular Probes, Leiden, Holanda) na concentração de 1:10.000 e fotografado sob luz ultra-violeta.

4.6.6 Análise dos dados do DGGE

Inicialmente, foi utilizado o *software Bionumerics 5.0* (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) para identificar as canaletas do gel, selecionar as bandas automaticamente e manualmente e transformar os dados do perfil do DGGE em valores, de acordo com a ausência/presença da banda e sua intensidade.

Os valores obtidos com *Bionumerics* foram utilizados por este mesmo programa para gerar o dendrograma do perfil do DGGE. Outras análises dos valores foram realizadas com o *software Past 2.0* (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Com este foi criado um gráfico de análises de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), e calculados os índices de diversidade (Shannon e Wiener) e riqueza (Chao). Por fim, os dados fornecidos pelo *Bionumerics* e pelo *Past* foram utilizados no Excel 2010, para criar diagramas de Venn e um gráfico associando diversidade e riqueza.

4.6.7 Análises estatística: Teste de Tukey

Para realizar as análises estatísticas foi utilizado o *software* R (Foudation for Statistical Computing, Vienna, Austria) com a interface RStudio. Utilizando este programa, foi feita análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, para verificar se haviam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o rendimento de DNA e entre as razões de pureza $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ obtidas pelas diferentes metodologias. A análise de variância também foi aplicado com os resultados da riqueza e diversidade levando em consideração a tabela F de Snedecor $\alpha = 0,05$.

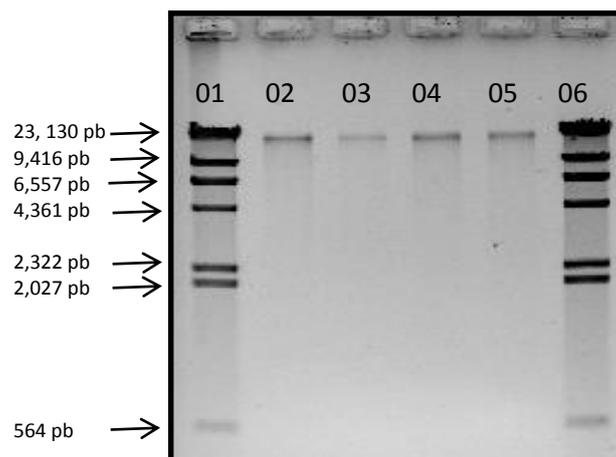
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA de água do mar pelo método de Rivera et al., 2003

A reprodutibilidade da técnica foi realizada para verificar se a metodologia de extração de DNA de água do mar gerava dados uniformes, uma característica desejável na metodologia aperfeiçoada. Assim, o protocolo descrito por Rivera et al. (2003) foi realizado em quadruplicata e os resultados foram quantificados usando NanoDrop e observado em gel de agarose.

Visualizando as concentrações de DNA obtidas ($17,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a $22,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) e pela eletroforese em gel de agarose (Figura 7), verificamos que há pouca variação entre os resultados, mostrando que a técnica é reprodutível.

Figura 7 – Gel de agarose do DNA obtido a partir de 100 mL de amostras de água do mar de acordo com o protocolo descrito por Rivera et al., 2003



Legenda: Colunas 01 e 06: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. Colunas 02, 03, 04 e 05: DNA extraído pelo método de Rivera et al., 2003.

5.2 Aperfeiçoamento do protocolo de Rivera et al., 2003

5.2.1 Processamento: ensaio para substituir os tubos Falcon (15 mL) por microtubos (2,0 mL)

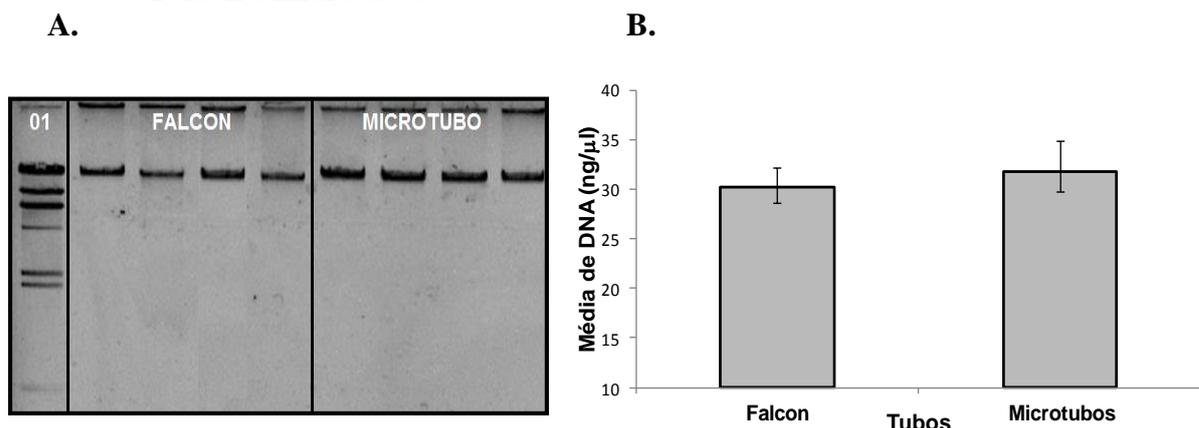
Essa etapa foi realizada antes dos procedimentos do aperfeiçoamento da extração de DNA. Com a substituição dos tubos Falcon por microtubos, facilitaríamos os experimentos, pois além de diminuirmos a quantidade de reagentes por amostra, realizaríamos mais testes simultaneamente.

Os pesquisadores no protocolo de Rivera et al. (2003), escolheram os tubos Falcon por permitirem melhor homogeneização durante a extração, pois as membranas utilizadas possuem 47 mm de diâmetro. Como propomos fazer os testes nos microtubos, foi preciso diminuir em 1/4 a quantidade de membranas dentro destes e, para compensar essa divisão, aumentamos em quatro vezes a quantidade de volume filtrado.

Analisando os resultados da quantificação da concentração de DNA, observamos uma média de 30,25 ng. μl^{-1} para as extrações feitas em tubos Falcon e 31,82 ng. μl^{-1} para as realizadas em microtubos (Figura 8).

Aplicando-se o teste *t* pareado nesses valores, verificamos que não houve diferença entre as extrações ($P > 0,05$). Portanto, é aceitável a substituição dos tubos Falcon por microtubos.

Figura 8 – Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar usando tubos Falcon e microtubos



(A) Fotografia do gel de agarose das extrações feitas em tubos Falcon e microtubo. Legenda: Coluna 01: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. (B) Média de DNA obtido das extrações de DNA feitas em tubos Falcon e microtubo. Nota: Os valores apresentados são médias das quadruplicatas e as barras dentro das colunas indicam a menor e maior concentração de DNA obtido.

5.2.2 Lise celular

5.2.2.1 Ação das glass beads

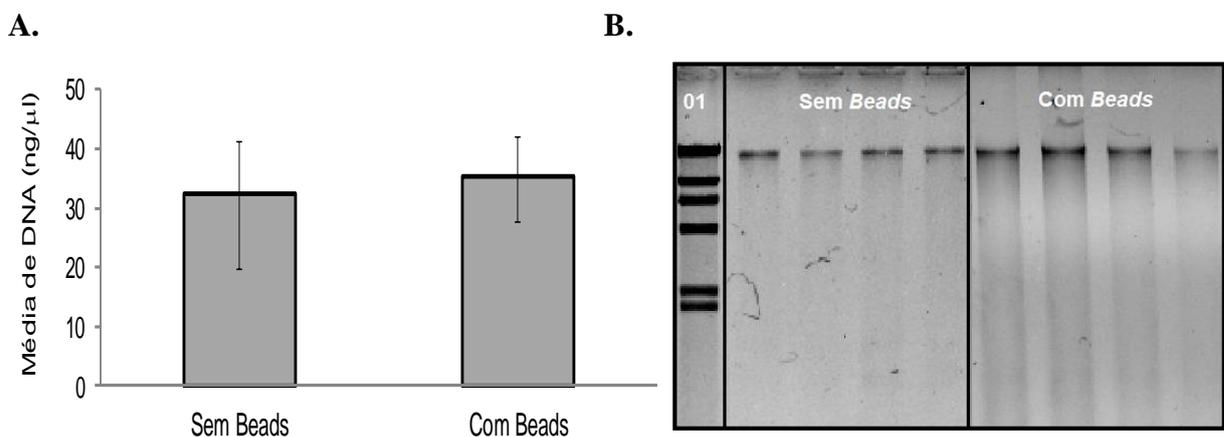
Esse teste foi realizado tendo como referência o trabalho de Boström et al. (2004) e teve como objetivo aumentar a concentração de DNA extraído. O procedimento *bead beating* é utilizado para romper as células. Dessa forma, as membranas são colocadas com as *beads* dentro de um tubo e agitadas em vortex. A eficiência da lise celular é alta, mas pode causar danos no DNA de acordo com a energia colocada no processo.

Alguns trabalhos usaram esta técnica para extrair DNA de amostras de água (AGOGUÉ et al., 2008; DE CORTE et al., 2009; MILLER et al., 1999). Para outros pesquisadores, esta forma de romper as células é somente para garantir uma extração mais uniforme (FUHRMAN et al., 1988; SOMERVILLE et al., 1989).

Em nossos experimentos, as extrações sem *beads* e com *beads* tiveram médias (quadruplicatas) de concentrações de DNA de 32,3 ng.µl⁻¹ e 35,37 ng.µl⁻¹, respectivamente (Figura 9A). Aplicando o teste *t* pareado nos resultados desta extração, observamos nas amostras que não houve diferenças significativas na concentração de DNA obtido ($P > 0,05$).

Além disso, analisando a foto do gel (Figura 9B) percebe-se que o DNA das extrações feitas com as *beads* aparece mais degradado, indicando presença de DNases ou quebra mecânica do DNA (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). As amostras com *beads* apresentam um “rastros” e trabalhos anteriores já observaram que estes são DNA retalhado (BÜRGMANN et al., 2001; FEINSTEIN; SUL; BLACKWOOD, 2009), sendo esta a principal desvantagem do procedimento *bead beating* (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008). Dessa forma, as *beads* não foram adicionadas ao protocolo aperfeiçoado.

Figura 9 – Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar com e sem adição de glass beads



(A) Média de DNA obtido das extrações de DNA feitas sem *beads* e com *beads*. Nota: Os valores mostrados são médias das quadruplicatas e as barras dentro das colunas indicam a menor e maior concentração de DNA obtido. (B) Fotografia do gel de agarose das extrações feitas sem *beads* e com *beads*. Legenda: Coluna 01: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III.

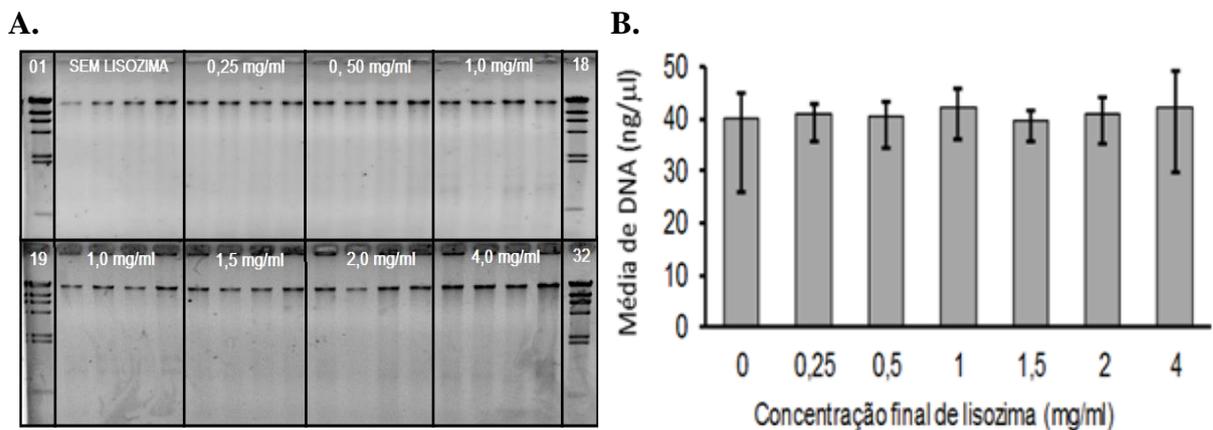
5.2.2.2 Concentração de lisozima

A lisozima tem papel fundamental na quebra da parede celular microbiana, atuando na quebra das ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ glicosídicas entre o ácido N-acetil-murâmico e N-acetil-D-glucosamina, presentes no peptídeoglicano da parede celular bacteriana (JOLLÈS, 1964).

Dessa forma, buscando conseguir maiores concentrações de DNA, variamos a concentração final de lisozima no protocolo de extração, utilizando como referência os trabalhos de Somerville et al. (1989), Rivera et al. (2003) e Boström et al. (2004). Entretanto, nos nossos resultados, não observamos diferenças significativas no rendimento de DNA ($P > 0,05$) quando utilizamos as distintas concentrações de lisozima (Figura 10).

No trabalho feito por Fuhrman et al. (1988), no qual foi desenvolvida uma técnica de extração de DNA de água, a lisozima não foi considerada necessária para a lise celular, e, ainda, dificultava a purificação do DNA devido à adição de proteínas. Outros estudos também concordam com essa afirmação (MILLER et al., 1999; OLSEN et al., 1986; TORSVIK, 1979). Visto isso e os nossos resultados, não utilizaremos a lisozima no protocolo aperfeiçoado.

Figura 10 – Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes concentrações finais de lisozima



(A) Fotografia do gel das extrações feitas com diferentes concentrações finais de lisozima. Legenda: Colunas 01, 18, 19 e 32: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. (B) Relação entre concentrações de lisozima e média de concentração de DNA obtido. Nota: Os valores apresentados são médias das quadruplicatas e as barras dentro das colunas indicam a menor e maior concentração de DNA obtido.

5.2.2.3 Concentração e tempo de ação de proteinase K

A proteinase K é uma enzima com a propriedade de degradar muitas proteínas no seu estado nativo, mesmo na presença de detergentes. O local predominante da clivagem da ligação peptídica é adjacente ao grupo carboxílico dos aminoácidos alifático e aromático (EBELING et al., 1974). Assim, buscando encontrar a melhor concentração e o menor tempo para se conseguir maiores rendimentos de DNA, ensaios foram realizados de acordo com as orientações dadas pelo fabricante.

É difícil definir uma concentração ideal de proteinase K a ser utilizada nas extrações de DNA de amostras de origem ambiental, devido às características particulares de cada amostra. Sendo assim, vemos diferentes concentrações desta enzima sendo utilizadas. Zhou, Bruns e Tiedje (1996), com o objetivo de extrair DNA total do solo, utilizaram a proteinase K na concentração final de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto no trabalho de Porteus e Armstrong (1991), foi utilizada na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Assim como para os solos, a extração de DNA total de água também possui variações na concentração de proteinase K. Observamos no trabalho de Boström et al. (2004), que esta enzima foi utilizada em $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 50 mL de água filtrada, enquanto Somerville et al. (1989), utilizou-a na concentração aproximada de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para volumes de 350 mL até 1 litro.

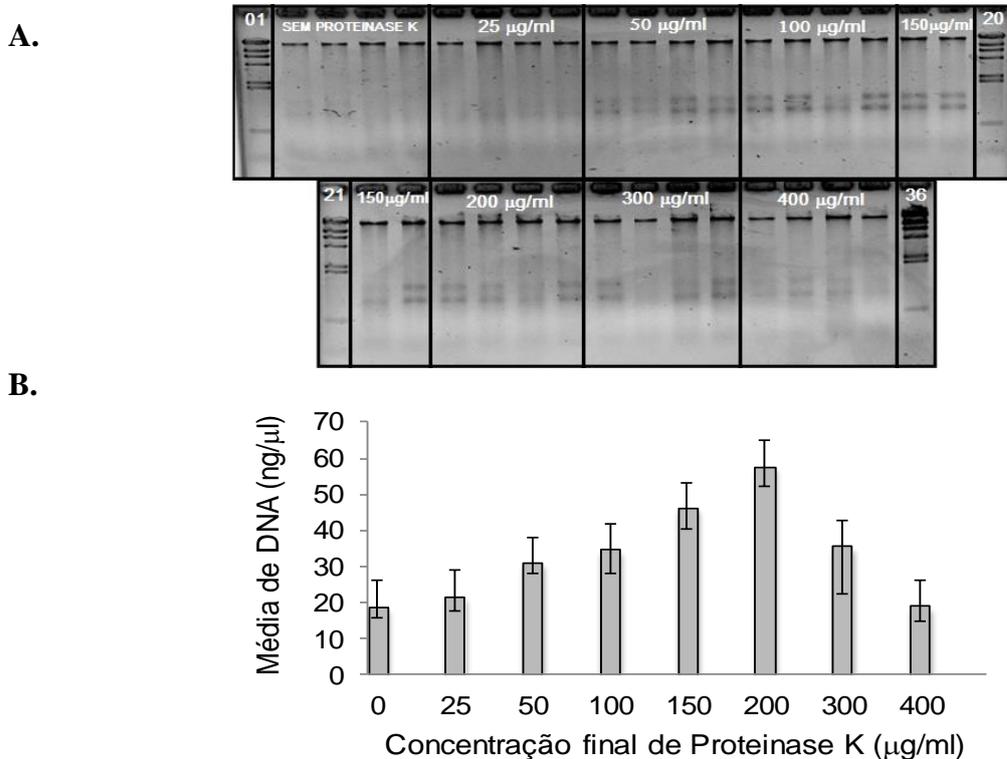
No nosso trabalho, visualizando a fotografia do gel de agarose (Figura 11A) é possível observar que as bandas de DNA (“risco” na parte superior do gel) aparecem mais intensas na concentração final de proteinase K igual a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, quantidade aproximada da recomendada por Rivera et al. (2003) ($220 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

A quantificação do DNA (Figura 11B) corroborou com esse resultado e através dela foi possível verificar, pelo teste *t* pareado que, nesta concentração final, a lise foi significativamente melhor ($P < 0,05$).

Com relação ao melhor tempo, aplicando o teste *t* pareado, observamos que com 30 minutos, uma e duas horas, a proteinase K não apresentou resultados significativamente diferentes ($P > 0,05$). Porém, estes foram significativamente melhores ($P < 0,05$) quando comparados com o tempo de 18h (*overnight*) (Figura 12). Uma das razões para este resultado pode estar relacionado a não homogeneização das amostras quando deixadas *overnight*.

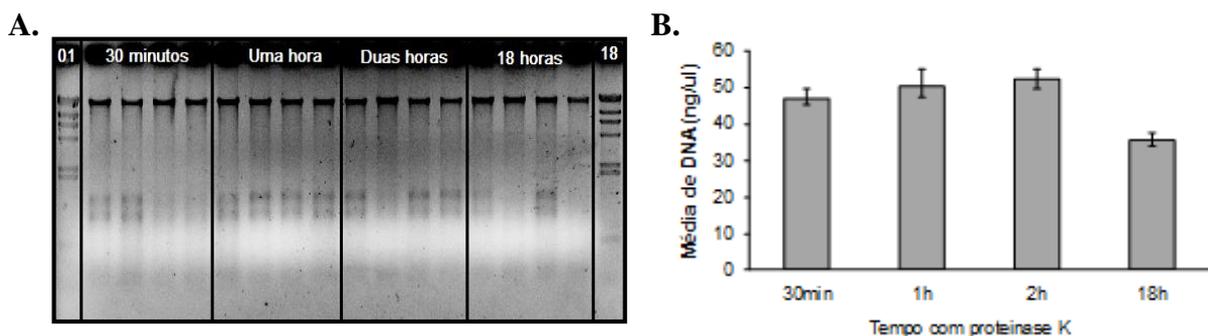
Através destes experimentos, concluímos que, para o protocolo aperfeiçoado, será utilizado a proteinase K na concentração final de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por um período de 30 minutos.

Figura 11 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes concentrações finais de proteinase K



(A) Fotografia do gel das extrações feitas com diferentes concentrações finais de proteinase K. Legenda: Colunas 01, 20, 21 e 36: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. (B) Relação entre concentrações de proteinase K utilizada e média do DNA obtido. Nota: Os valores apresentados são médias das quadruplicatas e as barras das colunas indicam a menor e maior concentração de DNA obtido.

Figura 12 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes intervalos de tempos de ação de proteinase K



(A) Fotografia do gel das extrações feitas com diferentes tempos de ação de proteinase K. Legenda: Colunas 01 e 18: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. (B) Relação entre tempo de ação de proteinase K utilizado e média do DNA obtido. Nota: Os valores apresentados são médias das quadruplicatas e as barras dentro das colunas indicam a menor e maior concentração de DNA obtido.

5.2.3 Tratamento adicional à lise celular e purificação: concentração final e tempo de ação do CTAB

O CTAB é um detergente que vem sendo utilizados por alguns autores na extração de DNA (CORINALDESI, 2005; DOYLE; DOYLE, 1987; ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Neste trabalho, testamos as concentrações (0%, 1%, 2% e 3%) e os tempos de ação (5min, 20min, 40min e 60min) deste reagente. Em nossos testes, todas as razões $A_{260/230}$ ficaram próximo do mínimo considerado ideal (1,5) (MO BIO, 2010) mas não houve diferença significativa ($P > 0,05$) quando usamos o CTAB na remoção dos possíveis compostos orgânicos e, conseqüentemente, na razão $A_{260/230}$. Uma possível explicação para o CTAB não ter interferido nesta razão pode ser devido às características das amostras usadas, que provavelmente não tinham altas concentrações destas impurezas orgânicas, como é encontrado em amostras de solos (HURT et al, 2001; ZHOU; BRUNS; TIEDJE, 1996). Entretanto, quando o CTAB não foi utilizado na extração, a quantificação no NanoDrop aparentemente foi afetada, pois observou-se maior concentração de DNA do que quando o CTAB foi utilizado nas concentrações finais de 1, 2 e 3% (Tabela 3), resultados que não foram confirmados visualmente em gel de agarose (Figura 13).

Dessa forma, mesmo que o uso do CTAB não tenha feito diferença na razão $A_{260/230}$, ele foi necessário para remover certas impurezas que estavam sendo quantificadas junto com o DNA. Assim, o CTAB permaneceu no protocolo aperfeiçoado da mesma forma que estava sendo utilizado no método de Rivera et al. (2003), ou seja, na concentração final de 1%.

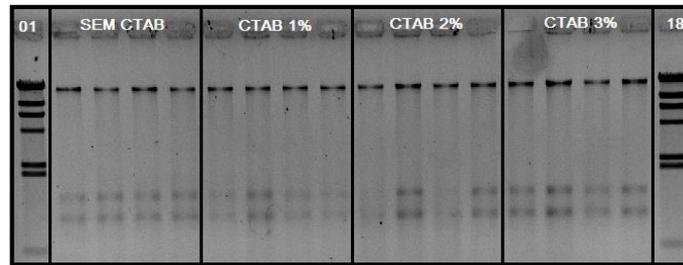
Em relação ao tempo de atuação do CTAB, visualizando a fotografia do gel (Figura 14) e pela confirmação pelo teste *t* pareado, referente aos resultados da Tabela 3, pode-se afirmar que com 5 minutos de atuação, a concentração de DNA foi significativamente menor ($P < 0,05$) que em outros tempos. Porém, com 20 minutos, não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$) em relação a maiores tempos comparando a concentração de DNA e a razão $A_{260/230}$.

Tabela 3– Concentração do DNA em amostras de água do mar e razão $A_{260/230}$ utilizando diferentes concentrações de CTAB

| Concentração final CTAB | Concentração de DNA (ng.µl ⁻¹) | $A_{260/230}$ |
|-------------------------|--|---------------|
| 0% | 100,5 ± 7,59 | 1,48 ± 0,01 |
| 1% | 42,9 ± 0,83 | 1,43 ± 0,07 |
| 2% | 42,8 ± 1,59 | 1,47 ± 0,02 |
| 3% | 38,8 ± 0,97 | 1,46 ± 0,07 |

Nota: Os valores apresentados são médias das quadruplicatas com seu respectivo desvio padrão.

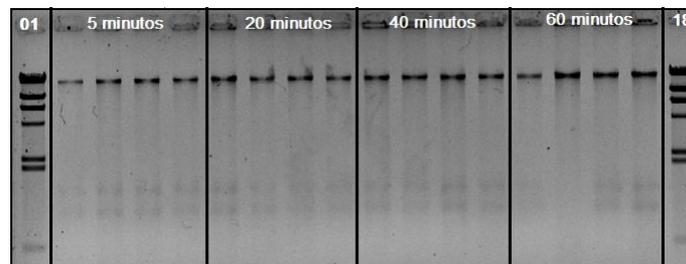
Figura 13 – Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes concentrações finais de CTAB



Legenda: Colunas 01 e 18: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III.

Em um estudo feito por Puchoa (2004), no qual foi avaliado o tempo de incubação com o detergente CTAB, verificou-se que não havia diferenças na concentração de DNA quando as amostras foram deixadas 5 minutos, 4 horas e *overnight*. Mesmo com este estudo, o tempo que foi fixado no protocolo aperfeiçoado foi o de 20 minutos, pois para nossas amostras, foi o que apresentou melhor relação tempo por concentração de DNA.

Figura 14 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando CTAB em diferentes intervalos de tempo



Legenda: Colunas 01 e 18: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III.

Tabela 4 – Concentração de DNA e razão $A_{260/230}$ em amostras de água do mar utilizando CTAB na concentração final de 1% e diferentes intervalos de tempo

| Tempo de ação CTAB | Concentração de DNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) | $A_{260/230}$ |
|--------------------|--|-----------------|
| 5min | $48,67 \pm 2,24$ | $1,45 \pm 0,06$ |
| 20min | $56,25 \pm 2,00$ | $1,48 \pm 0,02$ |
| 40min | $61,6 \pm 1,59$ | $1,45 \pm 0,07$ |
| 60min | $59,62 \pm 2,92$ | $1,42 \pm 0,06$ |

Nota: Os valores apresentados são médias das quadruplicatas com seu respectivo desvio padrão.

5.2.4 Purificação do DNA: tempo e força de centrifugação com: F: C: A e C: A

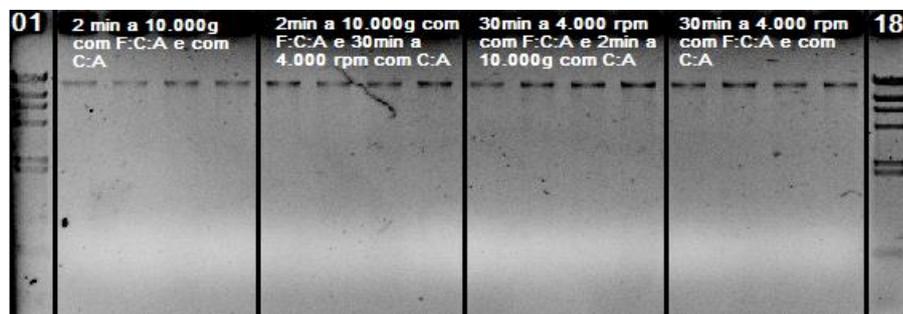
Após a adição da mistura orgânica (F: C: A), centrifuga-se a amostra, o que resultará em duas fases: uma superior aquosa (na qual estará presente o DNA) e uma inferior orgânica (na

qual estarão presentes as proteínas). Em alguns protocolos está presente mais uma etapa de purificação, com clorofórmio: álcool isoamílico. Esta também provocará a desnaturação das proteínas que permanecerão na fase inferior orgânica (AHMAD et al., 2004; URAKAWA; MARTENS-HABBENA; STAHL, 2010; WAHLBERG et al., 2012).

Dessa forma, testamos combinações de tempos e forças de centrifugação com as misturas F: C: A (25:24:1) e C: A (24:1) para purificar as amostras no menor tempo possível. As impurezas do DNA foram verificadas por espectrofotometria, assumindo que, quando a razão $A_{260/280}$ está entre 1,7 - 2,0, a amostra de DNA está livre de contaminação. Valores mais baixos que 1,7 indicam a presença de proteínas (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008; STEFFAN et al., 1988) e valores acima de 2,0, a presença de RNA (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Em nossos resultados, verificamos que podemos diminuir o tempo de centrifugação sem que haja diferenças significativas ($P > 0,05$) na contaminação do DNA por proteínas (Figura 15 e Tabela 5). Portanto, para o protocolo aperfeiçoado, concluímos que essas duas misturas (F: C: A e C: A) podem ser centrifugadas por 10.000 x g por apenas 2 minutos.

Figura 15 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes forças de centrifugação e intervalos de tempo com F:C:A e C:A



Legenda: Colunas 01 e 18: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III.

Tabela 5 – Força e tempo de centrifugação com F: C: A e C: A e sua relação quanto a concentração de DNA e razão $A_{260/280}$

| Amostras | Concentração de DNA (ng.µl ⁻¹) | $A_{260/280}$ |
|---|--|---------------|
| 2min a 10.00g com F: C: A e com C: A | 15,48 ± 3,69 | 1,75 ± 0,04 |
| 2min a 10.000g com F: C: A e 30min a 4.000rpm com C: A | 15,68 ± 1,96 | 1,77 ± 0,02 |
| 30min a 10.000g com F: C: A e 30min a 4.000 rpm com C: A | 13,86 ± 2,06 | 1,85 ± 0,05 |
| 30min a 4.000 rpm com F: C: A e com C: A | 14,48 ± 3,46 | 1,88 ± 0,08 |

Nota: Média da concentração de DNA (ng.µl⁻¹) e relação $A_{260/280}$ com seu respectivo desvio padrão.

5.2.5 Recuperação do DNA

5.2.5.1 Concentrações do coprecipitador (tRNA)

De acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), a adição de tRNA antes da precipitação pode ajudar a recuperar pequenas quantidades de DNA. De fato, alguns trabalhos afirmam que com a adição de tRNA em processos de extração de ácidos nucléicos, é possível recuperar mais RNA (WANG et al., 2002) e DNA (BOSTRÖM et al., 2004). Sendo assim, realizamos um experimento testando diferentes concentrações dessa molécula (0 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para verificar sua influência na precipitação de DNA.

Visualizando o DNA das extrações, no gel de agarose, verificamos que a banda de DNA se intensificou quando aumentamos a concentração de tRNA até aproximadamente 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e que, após esta quantidade, houve uma estabilização da concentração de DNA extraído (Figura 16A). No trabalho feito por Boström et al. (2004), foi realizado um experimento parecido, mas eles quantificaram o DNA recuperado (PCR real-time) e observaram que, utilizando o tRNA na concentração final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ocorria a máxima recuperação de DNA.

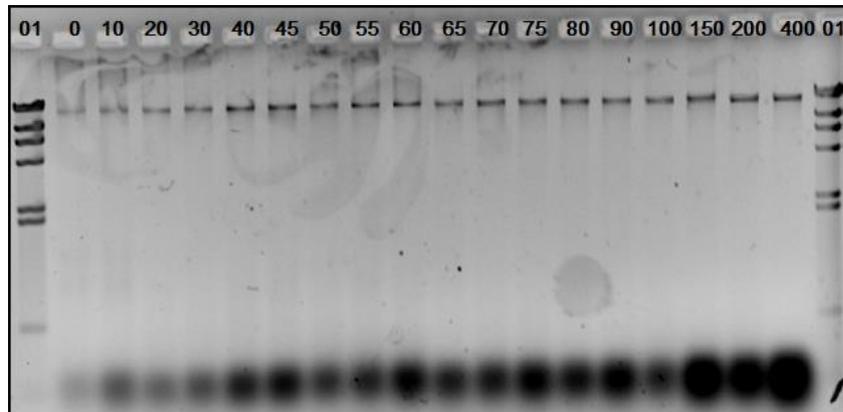
Além da observação visual no gel de agarose, nossas extrações foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop) e, diferente do que foi visto no gel, as concentrações de DNA foram maiores, conforme mais tRNA estava presente (Figura 16B). Porém, estávamos quantificando o tRNA colocado no processo de extração (borrão escuro na parte inferior do gel), pois verificamos que o comprimento de onda que se utiliza para quantificar o DNA (260 nm) é o mesmo usado para quantificar o tRNA (TRIFUNAC; KRASNA, 1974).

De qualquer forma, como o tRNA ajudou na precipitação do DNA, acrescentamos esta etapa ao protocolo de Rivera et al. (2003) aperfeiçoado. Deste modo, juntamente com o precipitador isopropanol, recomendamos adicionar tRNA na concentração final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, uma vez que Boström et al. (2004) verificaram que essa era a melhor concentração final a ser utilizada e nós obtivemos resultados semelhantes.

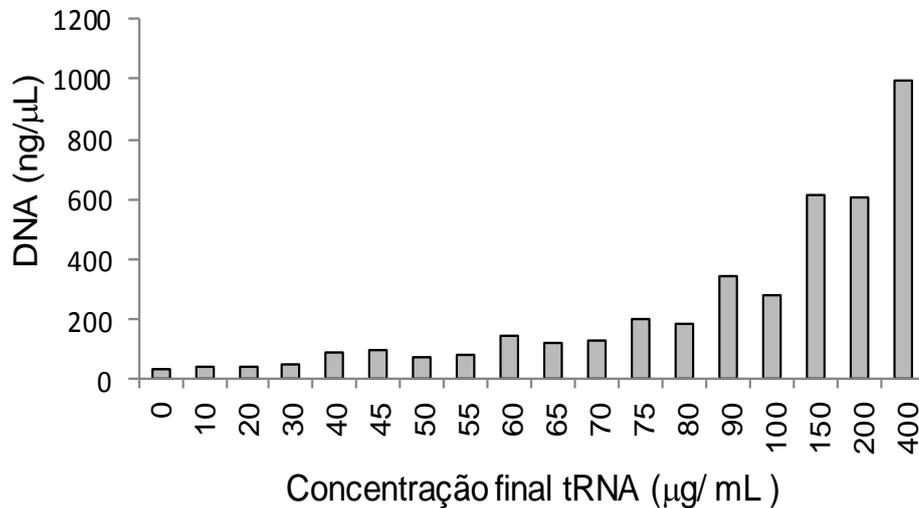
Uma desvantagem do uso deste coprecipitador, como foi visto, é que o DNA e o tRNA absorvem na mesma faixa de luz ultra violeta. Dessa forma, o seu uso não é aconselhado quando é necessário quantificar, por espectrofotometria, a concentração de DNA.

Figura 16 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes concentrações do coprecipitador tRNA

A.



B.



(A) Fotografia do gel das extrações feitas com diferentes concentrações de tRNA. Legenda: Colunas 01: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. Outras colunas estão identificadas com as concentrações de tRNA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). (B) Extrações com diferentes concentrações de tRNA.

5.2.5.2 Agentes precipitadores

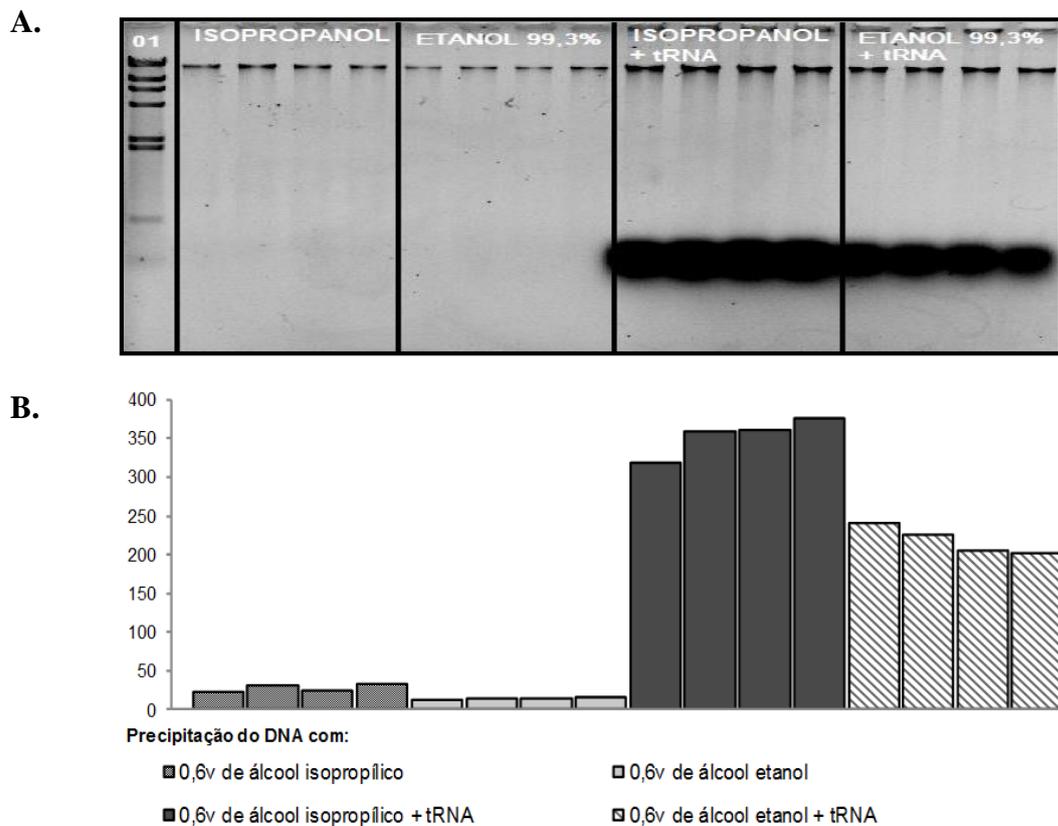
A precipitação do DNA geralmente é feita utilizando álcool (etanol ou isopropanol) associado a uma solução com específica concentração de um sal catiônico. Estes fazem os ácidos nucleicos se agregarem e, conseqüentemente, precipitarem. Esse processo pode ser maximizado quando realizado em baixas temperaturas, sendo assim aconselhado (OLIVEIRA et al., 2007).

Em nosso trabalho, observamos que a precipitação do DNA é diferente quando utilizamos o isopropanol ou etanol absoluto. Comparando as duas maneiras, pelo teste *t* pareado, observamos que existem diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os dados, podendo-se assim afirmar que o isopropanol é mais eficiente que o etanol absoluto para precipitar o DNA.

Quando foi adicionado o tRNA ao agente precipitador, verificamos visualmente que o rendimento melhorou (Figura 17A). Também é possível visualizar esse aumento por espectrofotômetro (Figura 17B), porém, como já foi discutido, o tRNA influencia na quantificação do DNA. As médias das extrações foram: 27,45 ng. μL^{-1} quando as amostras foram precipitadas com 0,6 v de isopropanol, 13,92 ng. μL^{-1} quando utilizamos 0,6 v de etanol absoluto, 353,57 ng. μL^{-1} quando utilizamos 0,6 v isopropanol + tRNA na concentração final de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e 218 ng. μL^{-1} para as amostras precipitadas com 0,6 v de etanol absoluto + tRNA na concentração final de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

Com estes resultados, recomendamos no protocolo aperfeiçoado o uso de 0,6 v de isopropanol + tRNA na concentração final de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Além disso, como em baixas temperaturas a precipitação é maximizada, indicamos o uso de isopropanol gelado e uma incubação por 5 minutos no gelo antes do próximo passo.

Figura 17 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes agentes precipitadores



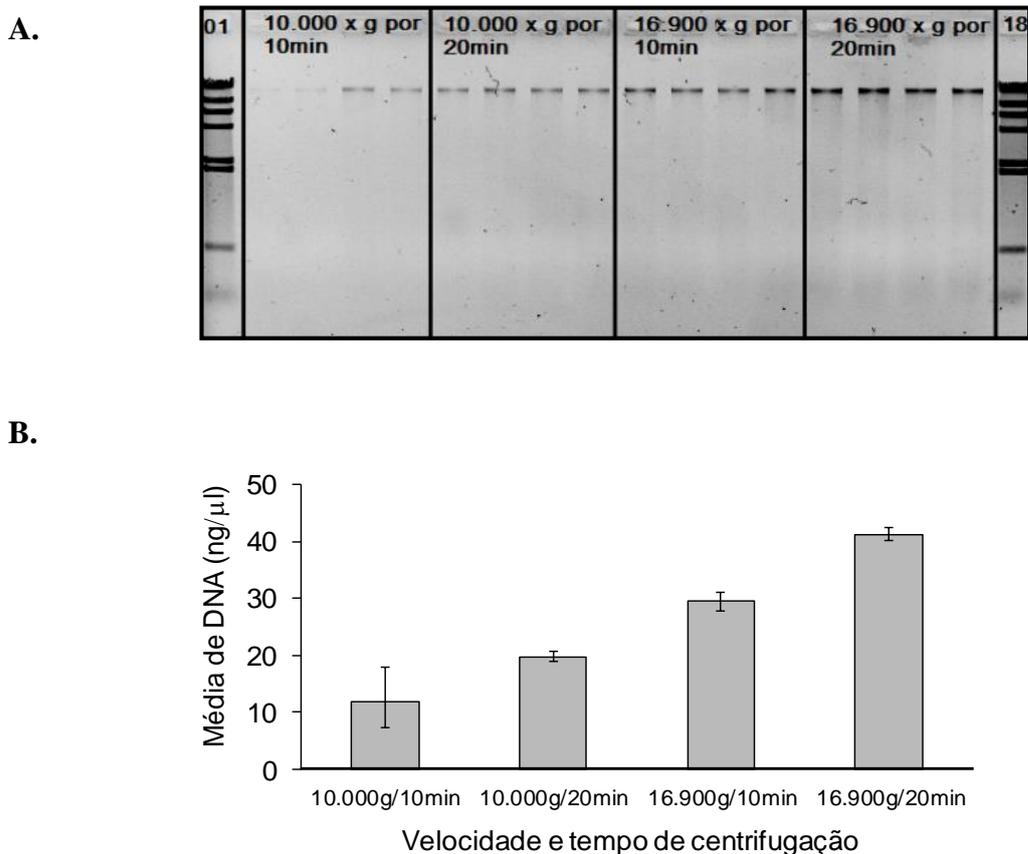
(A) Fotografia do gel das extrações feitas com diferentes agentes precipitadores. Legenda: Coluna 01: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. **(B)** Extrações feitas com diferentes agentes precipitadores.

5.2.5.3 Tempo e velocidade de centrifugação para precipitação do DNA

Quando cultivamos uma bactéria para realizar a extração de DNA, a quantidade de DNA recuperada é tão grande que forma uma rede de filamentos visíveis, tornando possível “pescar” o DNA com auxílio de um capilar de vidro. Porém, quando se faz extração de DNA de amostras de água, a quantidade de DNA não é suficiente para formar essa rede e, então, devemos centrifugar a amostra.

Dessa forma, testamos diferentes forças e tempos de centrifugação para observar esta recuperação, e verificamos que quando aumentamos a força e tempo de centrifugação, a concentração de DNA recuperado aumentou significativamente ($P < 0,05$) (Figura 18). Como desejávamos quantificar as amostras, o tRNA não foi utilizado neste teste.

Figura 18 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes tempos e velocidades de centrifugação



(A) Fotografia do gel das extrações feitas com diferentes tempos e velocidades de centrifugação. Legenda: Coluna 01 e 18: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. (B) Extrações de DNA feitas com diferentes tempos e velocidades de centrifugação. Nota: Os valores apresentados são médias das quadruplicatas. As barras das colunas indicam a menor e maior concentração de DNA obtido.

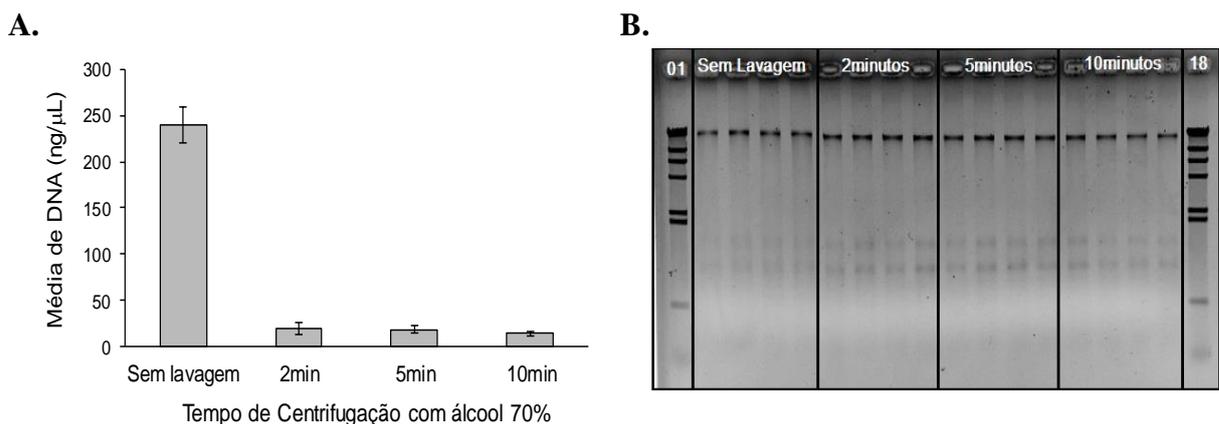
5.2.5.4 Lavagem com etanol 70%

O etanol 70% é utilizado para remover resíduos de sais na amostra ou de sais que foram usados para melhorar a precipitação do DNA na extração (OLIVEIRA et al., 2007). Neste experimento, utilizamos diferentes tempos de centrifugação (2, 5 e 10 minutos em rotação 10.000 x g) com etanol 70% para verificar sua influência na concentração de DNA. Além disso, para verificar se esta etapa era realmente necessária, um teste sem esta lavagem foi realizado. Não utilizamos o tRNA para podermos quantificar as amostras.

Com nossos resultados, concluímos que esta etapa é necessária para realizar a quantificação do DNA no NanoDrop. Podemos observar na figura 19A que a ausência da lavagem resultou em uma quantificação muito maior que o das outras amostras (lavadas com etanol 70%). Resultados que não se confirmaram visualmente pela figura 19 B, uma vez que as bandas de DNA apresentaram a mesma intensidade. Como o resultado da lavagem com etanol 70% foi o mesmo em todos os tempos, no protocolo aperfeiçoado ficou estabelecido o tempo mínimo de 2 minutos.

No quadro 2 estão apresentadas as etapas do protocolo de extração de DNA de água do mar, descrito por Rivera et al. (2003), que foram trabalhadas para serem aperfeiçoadas.

Figura 19 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes tempos de centrifugação na etapa de lavagem com etanol 70%



(A) Relação dos tempos de centrifugação com etanol 70% e DNA obtido. Nota: Os valores apresentados são médias das quadruplicatas. As barras dentro das colunas indicam a menor e maior concentração de DNA obtido. (B) Fotografia do gel das extrações feitas com diferentes tempos de centrifugação com etanol 70%. Legenda: Coluna 01 e 18: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III.

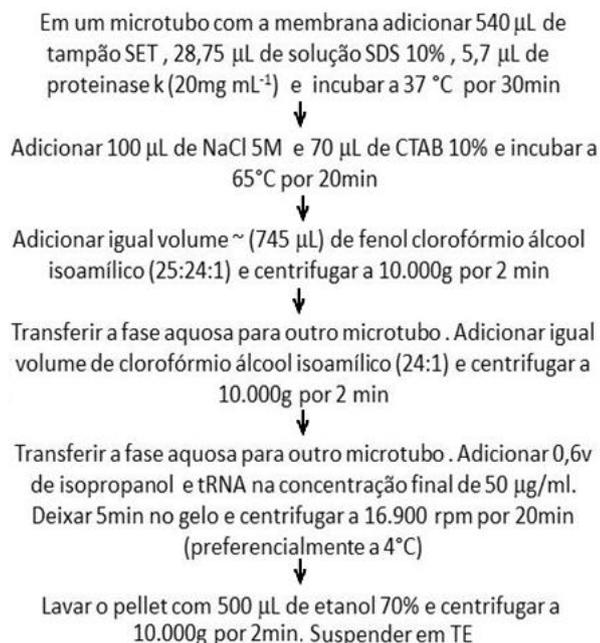
Quadro 2 – Resumo das etapas para obtenção do protocolo de extração de DNA: Rivera et al. (2003) aperfeiçoado

| Etapas | Testes realizados | Melhor resultado |
|--|--|--|
| Adição de <i>Glass Beads</i> . | Uso adicional | Não necessário. |
| Concentração final Lisozima. | 0 mg.mL ⁻¹ , 0,25 mg.mL ⁻¹ , 0.5 mg.mL ⁻¹ , 1.0 mg.mL ⁻¹ , 1.5 mg.mL ⁻¹ , 2.0 mg.mL ⁻¹ e 4.0 mg.mL ⁻¹ | Não necessária. |
| Concentração final Proteinase K. | Zero, 25 µg.mL ⁻¹ , 50 µg.mL ⁻¹ , 100 µg.mL ⁻¹ , 150 µg.mL ⁻¹ , 200 µg.mL ⁻¹ , 300 µg.mL ⁻¹ e 400 µg.mL ⁻¹ | 200 µg.mL ⁻¹ . |
| Tempo de ação Proteinase K. | 30min, 1h, 2h e <i>overnight</i> . | 30min. |
| Concentração final de CTAB. | 0%, 1%, 2% e 3%. | 1%. |
| Tempo de ação do CTAB. | 5min, 20min, 40min e 1h. | 20min. |
| Tempo e Centrifugação com F: C: A. | 30min a 4.000 rpm e 2min a 10.000 x g. | 2min a 10.000 x g. |
| Tempo e Centrifugação com C: A. | 30min a 4.000 rpm e 2min a 10.000 x g. | 2min a 10.000 x g. |
| Concentração final coprecipitador (tRNA). | 0 µg.mL ⁻¹ , 10 µg.mL ⁻¹ , 20 µg.mL ⁻¹ , 30 µg.mL ⁻¹ , 40 µg.mL ⁻¹ , 45 µg.mL ⁻¹ , 50 µg.mL ⁻¹ , 55 µg.mL ⁻¹ , 60 µg.mL ⁻¹ , 65 µg.mL ⁻¹ , 70 µg.mL ⁻¹ , 75 µg.mL ⁻¹ , 80 µg.mL ⁻¹ , 90 µg.mL ⁻¹ , 100 µg.mL ⁻¹ , 150 µg.mL ⁻¹ , 200 µg.mL ⁻¹ , 400 µg.mL ⁻¹ . | 50 µg.mL ⁻¹ . |
| Para precipitar o DNA. | 1) Adição de 0,6 v de isopropanol, 2) Adição de 0,6 v de etanol absoluto, 3) Adição de 0,6 v de isopropanol + tRNA na concentração final de 50 µg.mL ⁻¹ e 4) Adição de 0,6 v de etanol absoluto + tRNA na concentração final de 50 µg.mL. | 3) Adição de 0,6v isopropanol + tRNA na concentração final de 50 µg.mL ⁻¹ . |
| Tempo e velocidade de centrifugação para precipitação do DNA. | 10.000 x g por 10min, 10.000 x g por 20min, 16.900 x g por 10min e 16.900 x g por 20min. | 16.900 x g por 20min. |
| Tempo de lavagem do DNA com etanol 70% - Centrifugando a 10.000 g. | 2min, 5min e 10min. Também foi feito um teste omitindo essa etapa. | 2min. |

5.2.6 Protocolo aperfeiçoado obtido após os testes realizados nos itens anteriores

Filtrar a amostra de água do mar em membrana de policarbonato de 0,22 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro e, em seguida, lavá-la com água de diluição filtrando metade do volume usado de água do mar. Cortar a membrana em pequenos pedaços e transferi-los para quatro microtubos (2 mL). Adicionar 540 µL de tampão SET, 28,75 µL de solução de SDS 10% e 5,7 µL de proteinase K (20 mg.mL⁻¹) e incubar a 37 °C por 30 min. Posteriormente, adicionar 100 µL de NaCl 5 M e 70 µL de solução CTAB 10% pré-aquecida a 65 °C. Incubar os tubos nessa temperatura por 20 minutos, agitando a cada 5 minutos. Aos tubos, adicionar igual volume (~ 745 µL) da mistura F: C: A e homogeneizar gentilmente. Em seguida, centrifugar os tubos a 10.000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente. Transferir a fase aquosa para outro microtubo (2 mL) e adicionar igual volume da mistura C: A. Homogeneizar gentilmente e centrifugar a 10.000 g por 2 minutos à temperatura ambiente. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo e adicionar 0,6 volume de isopropanol + tRNA na concentração final da solução de 50 µg.mL⁻¹. Deixar 5 min no gelo e centrifugar a 16.900 x g por 20 minutos (preferencialmente na temperatura de 4 °C). Posteriormente, descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 500 µL de etanol 70% gelado e, em seguida, centrifugar a 10.000 g por 2 minutos. Verter completamente o microtubo para descartar o sobrenadante e coloca-los para secar em temperatura ambiente ou no dessecador. Após a secagem, suspender o DNA em 30 µL de tampão TE e estocar a 4 °C (Figura 20).

Figura 20 – Protocolo aperfeiçoado para extrair DNA de água do mar



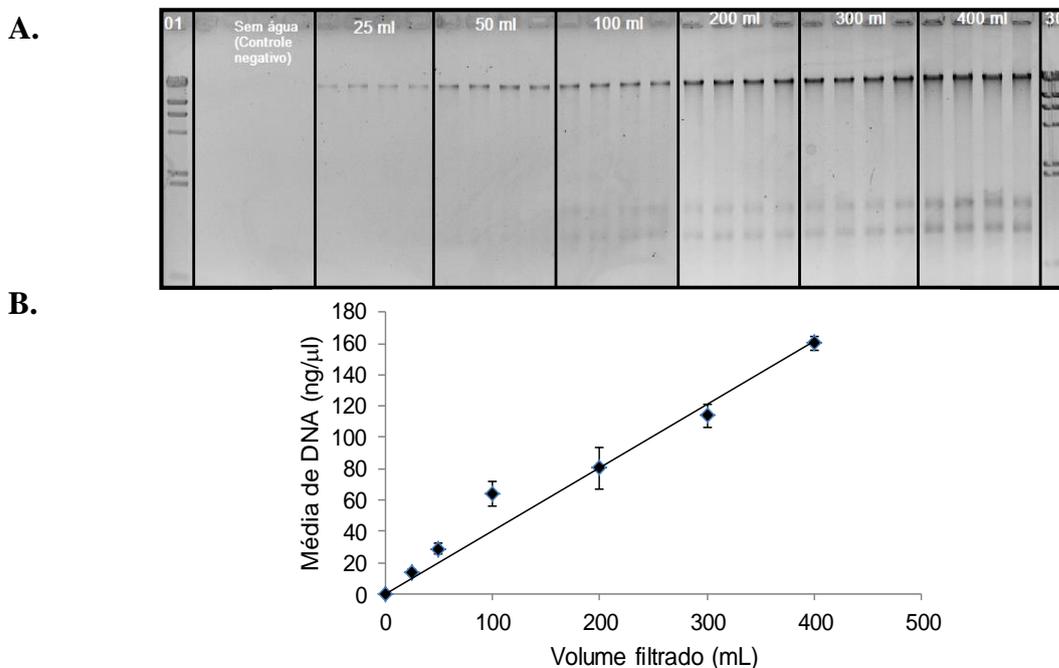
5.3 Comparação entre a concentração de DNA obtido e o volume filtrado de amostras de água do mar

Diferentes volumes de água são utilizados para realizar extração de DNA de água do ambiente. Qian et al. (2011) e Sogin et al. (2006), utilizaram 1 litro de água para fazer extração do DNA. Lee et al. (2010), usaram 4 litros de água, enquanto Almeida (2009), utilizou apenas 0,25 litros e Silveira et al. (2011), apenas 0,1 litros.

Como não existe uma quantidade padronizada de água a ser filtrada para realizar a extração de DNA, testamos o protocolo aperfeiçoado com diferentes volumes, sem o uso de tRNA, para verificar se a quantidade de DNA recuperada na extração era proporcional ao aumento de água filtrada.

Observamos pelo aumento da intensidade da banda (Figura 21A) e pelo aumento da média de DNA recuperado (Figura 21B) que, quando aumentamos o volume de água filtrado, mais DNA pode ser recuperado. Esse resultado indica que entre 25 mL a 400 mL de água, o protocolo de extração de DNA aperfeiçoado está funcionando de forma proporcional, não sendo necessária a alteração de quantidades dos reagentes presentes.

Figura 21 - Comparação do DNA obtido em amostras de água do mar utilizando diferentes volumes de água filtrada



(A) Fotografia do gel das extrações feitas com diferentes volumes de água. Legenda: **Colunas 01 e 30:** marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. (B) Relação de proporção entre volume de água filtrado e concentração de DNA obtido. Nota: 1) Os valores apresentados são médias da concentração do DNA ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) das quadruplicatas dos diferentes volumes de água utilizados em mL 25, 50, 100, 200, 300 e 400. 2) As barras cruzando os pontos das médias são os desvios padrão.

5.4 Comparação das metodologias de extração de DNA

Evidentemente, não existe um método único e ideal para realizar extração de DNA de amostras de origem ambiental. Por esse motivo, existem diferentes protocolos buscando alcançar uma extração uniforme, com alto rendimento e pureza do DNA. Porém, atingir todos estes objetivos ao mesmo tempo é uma tarefa difícil (LEFF et al., 1995).

Em nosso trabalho, na figura 22 e na tabela 6, podemos ver o resultado das extrações de DNA feitas pelas metodologias de Rivera et al. (2003), Rivera et al. (2003) aperfeiçoado com e sem tRNA, *Kit* comercial *Power Water* DNA e *Kit* comercial *Power Soil* DNA. Entre a metodologia de Rivera et al. (2003) e Rivera et al. (2003) aperfeiçoada sem tRNA, é imperceptível a diferença da quantidade de DNA obtido quando visualizamos apenas a figura 22. No entanto, observando a quantificação, exibida na tabela 6, vemos uma média de concentração de DNA significativamente maior na técnica aperfeiçoada sem tRNA ($P < 0,05$).

Com relação ao protocolo aperfeiçoado com tRNA, observamos, no gel de agarose, que a concentração de DNA está mais intensa que as demais (Figura 22). Esta mesma técnica apresentou maior concentração de DNA quando quantificada no NanoDrop. No entanto, devemos ser cautelosos, pois como já discutido, o coprecipitador (tRNA) interfere na quantificação do DNA.

Os *kits* comerciais, renderam significativamente menos DNA ($P < 0,05$) na quantificação pelo NanoDrop (Tabela 6), e esses dados foram confirmados na figura 22, onde é possível ver somente um leve “rastros” de DNA no gel de agarose. A metodologia *Power Water* teve o pior rendimento de DNA total, porém ela ficou dentro do esperado ($3 - 11 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) informado no manual de instruções do fabricante.

A razão $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$ nos indica a qualidade do DNA e estas ficaram mais próximas dos valores considerados ótimos quando as técnicas de Rivera et al. (2003) e Rivera et al. (2003) aperfeiçoado com e sem tRNA foram usadas para extrair o DNA e os *kits*, tiveram os mais baixos valores (Tabela 6).

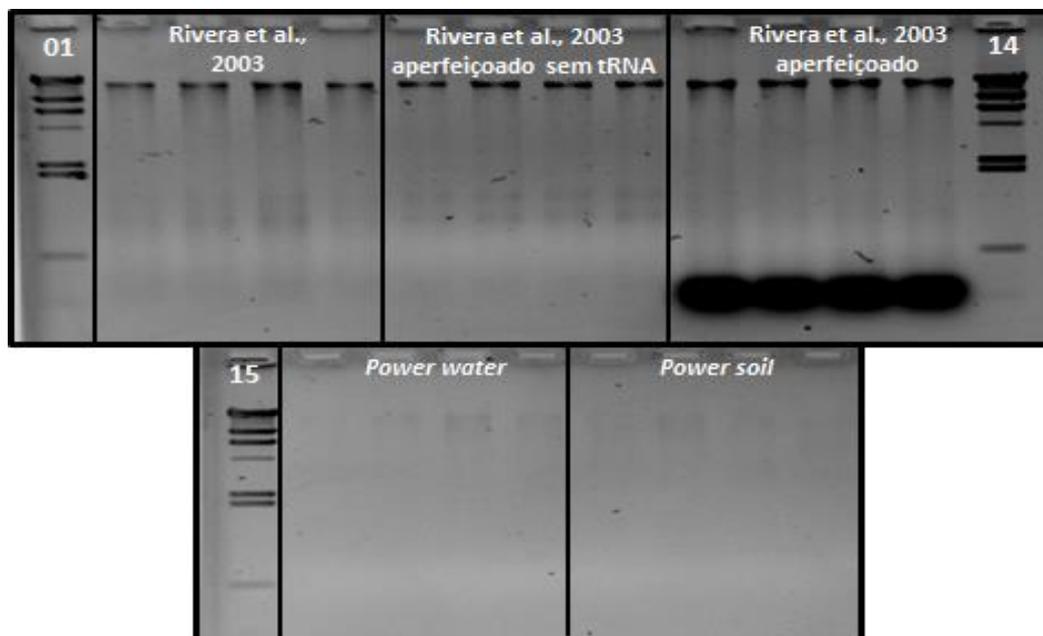
A primeira razão ($A_{260/230}$) informa a quantidade de DNA em relação a outros compostos que absorvem luz no comprimento de onda de 230 nm. São considerados como componentes que absorvem em 230 nm: compostos orgânicos, como polissacarídeos (BILGIN; DELUCIA; CLOUGH, 2009), fenol e sais caotrópicos, tais como o sal guanidina, usado em métodos de extração de DNA em colunas (THERMO-SCIENTIFIC, 2009) e compostos alcoólicos (ROGERS et al., 2007).

Para a empresa MO BIO (MO BIO, 2010), especialista na produção de *kits* de extração de DNA, a razão $A_{260/230}$ precisa estar acima de 1,5 para considerar que o DNA está livre dos contaminantes que absorvem o comprimento de onda de 230 nm. Entretanto, segundo Bilgin, DeLucia e Clough (2009), e o fabricante do espectrofotômetro que utilizamos (THERMO-SCIENTIFIC, 2009), esta razão precisa estar acima de 2,0. Já outros pesquisadores consideram como amostra pura uma razão acima de 1,8 (ALEKSIC et al., 2012).

A segunda razão $A_{260/280}$ informa a quantidade de DNA em relação a proteínas e RNA. Foi considerado que, quando a razão $A_{260/280}$ está entre 1,7-2,0, a amostra de DNA está livre de contaminação. Valores mais baixos que 1,7 indicam a presença de proteínas (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008; STEFFAN et al., 1988) e valores acima de 2,0, a presença de RNA (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Levando em consideração o tempo de execução, o protocolo aperfeiçoado gasta aproximadamente quatro vezes menos tempo que o descrito por Rivera et al., 2003. No entanto, os *kits* de extração são cerca de três vezes mais rápidos que o protocolo aperfeiçoado.

Figura 22 – Comparação das metodologias de extração de DNA total utilizando 100 mL de água do mar



Legenda: Fotografia de Gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. **Colunas 01, 14, 15:** marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III.

Tabela 6 - Comparação das metodologias de extração de DNA utilizando 100 mL de água do mar

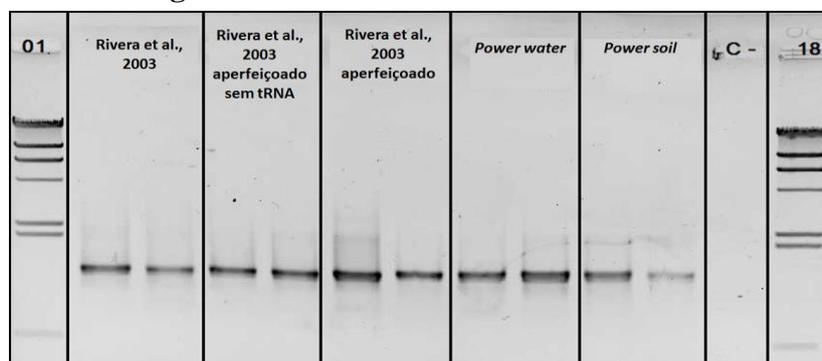
| Métodos de extração | Média Concentração DNA (ng.µL ⁻¹) | Relação A _{260/230} | Relação A _{260/280} | Tempo aproximado |
|--|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Rivera et al., 2003 | 35,77 ± 4,62 | 1,48 ± 0,01 | 1,74 ± 0,03 | 5h |
| Rivera et al., 2003 aperfeiçoado sem tRNA | 45,42 ± 4,87 | 1,43 ± 0,06 | 1,63 ± 0,02 | 1h e 20 min |
| Rivera et al., 2003 aperfeiçoado (com tRNA) | 158,35 ± 18,51 | 1,74 ± 0,06 | 2,05 ± 0,02 | 1h e 20 min |
| Power Water | 8,42 ± 2,48 | 0,28 ± 0,16 | 1,44 ± 0,10 | 30 min |
| Power Soil | 10,55 ± 3,06 | 0,23 ± 0,11 | 1,35 ± 0,08 | 30 min |

Nota: Média da concentração de DNA (ng.µL⁻¹), relação A_{260/230} e A_{260/280} com seus respectivos desvios padrão.

5.5 Integridade do DNA – PCR 16S RNAr

As cinco metodologias citadas acima foram analisadas quanto a integridade do DNA, utilizando a técnica da PCR. Assim, realizamos a amplificação do gene 16S RNAr, com 5 ng.µL⁻¹ do DNA das amostras, e todas tiveram resultados positivos (Figura 23). Este resultado é uma boa maneira de avaliar, também, o nível de pureza do DNA, pois envolve sucessivas reações enzimáticas que exigem sítios livres de contaminação no DNA (ROH et al., 2006) em relação aos ácidos húmicos, como já foi visto, a Taq polimerase pode ser inibida por quantidades menores que 1 mg.mL⁻¹ (TSAI; OLSON, 1992; TEBBE; VAHJEN, 1993). Este teste para verificar a integridade do DNA tem sido utilizado em muitos trabalhos (ALEKSIC et al., 2012; BOSTRÖM et al., 2004; HURT et al, 2001; LEAR; DONG; LEWIS, 2010; ROGERS et al., 2007; WAHLBERG et al., 2012).

Figura 23 - Amplificação do gene 16S RNAr usando DNA extraído por diferentes metodologias



Legenda: Coluna 01 e 18: marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. C-: Controle negativo.

5.6 Avaliação dos efeitos dos métodos de extração de DNA na comunidade bacteriana por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

Para verificar a importância dos métodos de extração de DNA no estudo dos micro-organismos por métodos independentes de cultivos, foi feita a caracterização da diversidade bacteriana marinha, por DGGE, utilizando os seguintes métodos de extração DNA:

i) CTAB aperfeiçoado com lisozima e sem tRNA (C+L-T)

Este método é o protocolo de Rivera et al. (2003) que foi aperfeiçoado neste estudo com as seguintes modificações: i) inserção de lisozima e ii) retirada do tRNA. Durante a padronização da extração foi visto que a lisozima não alterava a concentração do DNA obtido. Porém, como ela está relacionada com a lise da parede celular microbiana, a inserimos na metodologia modificada, uma vez que a enzima pode facilitar a lise de bactérias Gram-positivas presente na amostra de água do mar.

ii) CTAB aperfeiçoado sem tRNA (C-T)

Este método é o protocolo de Rivera et al. (2003) que foi padronizado neste trabalho sem a presença do coprecipitador tRNA. Em nosso estudo, assim como de Boström et al. (2004), o tRNA aumentou a recuperação do DNA e, portanto, a concentração do DNA obtido. Devido esse aumento, resolvemos comparar o perfil microbiano gerado pelo DGGE deste método (sem tRNA) com o método que contém o tRNA (CTAB aperfeiçoado). Além disso, o perfil deste método servirá como referência para comparação com o perfil gerado pelo método (C+L-T), permitindo verificar se a lisozima usada na extração pode influenciar nas bactérias observadas.

iii) CTAB aperfeiçoado (C)

Este é o método de extração de Rivera et al. (2003) aperfeiçoado neste estudo. Esta técnica foi utilizada como referência para verificarmos se o tRNA foi capaz de influenciar na composição da comunidade bacteriana observada no DGGE, pois observando o perfil de banda deste método com o método que não possui o tRNA (C-T) poderíamos verificar se encontramos distintos micro-organismos.

iv) *Power Soil* (PS)

O *Power Soil* é um *kit* comercial para extração de DNA de solo. Ele foi escolhido, pois é um método barato se comparado com a versão para água (*Power Water*) e é um método de

extração de DNA que vem sendo utilizado não somente no solo, mas também em saliva (WU et al., 2014), fezes (KENNEDY et al., 2014) e recife de corais (SANTOS et al., 2012).

v) *Power Water* (PW)

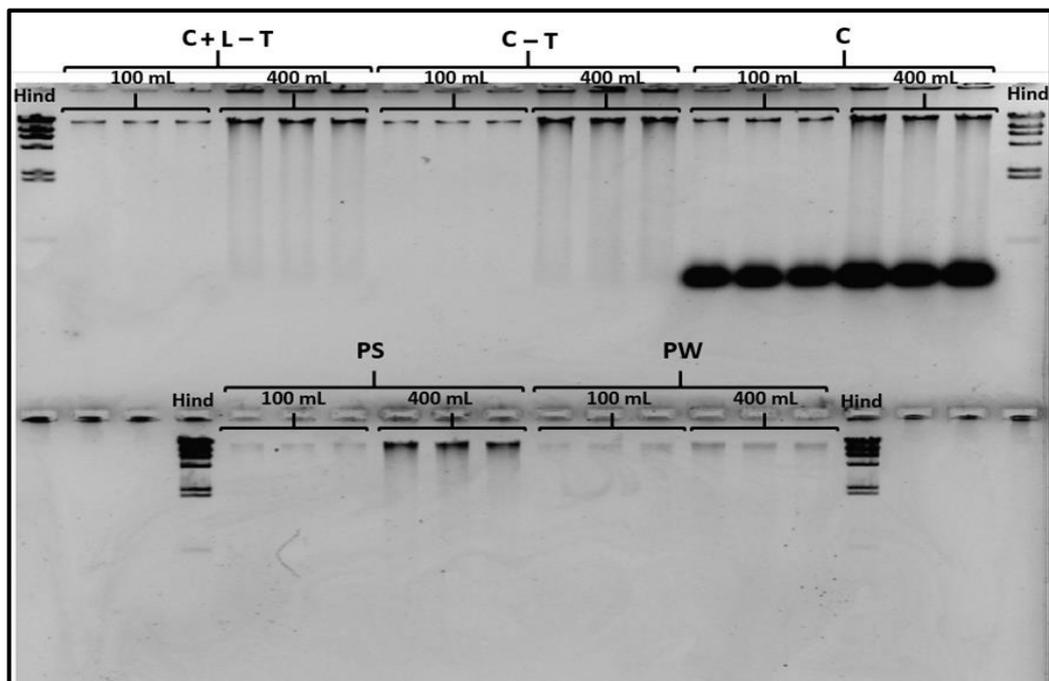
Este método é um *kit* comercial para extrair DNA de água e que vem sendo utilizado para este propósito (GIVENS, et al., 2014; HARRINGTON et al., 2012; MOYER et al., 2014).

O resultado do DNA extraído, em triplicata, utilizando os cinco métodos de extração e os dois volumes diferentes (100 mL e 400 mL) pode ser visto na Figura 24.

Observando a intensidade das bandas não é possível afirmar qual metodologia resultou na maior concentração de DNA. No entanto, fica evidente que as metodologias (C+L-T, C-T e C) tiveram maior rendimento que os kits *Power Soil* e *Power Water*, sendo o *kit* específico para extrair DNA de água (*Power Water*) o método que teve a menor intensidade da banda de DNA, ou seja, o menor rendimento de DNA.

Além disso, fica destacado na figura 24 que quando foi utilizado o volume de 400 mL para realizar a extração, as metodologias resultaram em maior rendimento de DNA.

Figura 24 - Extração de DNA de 100 mL e 400 mL de água do mar utilizando diferentes métodos

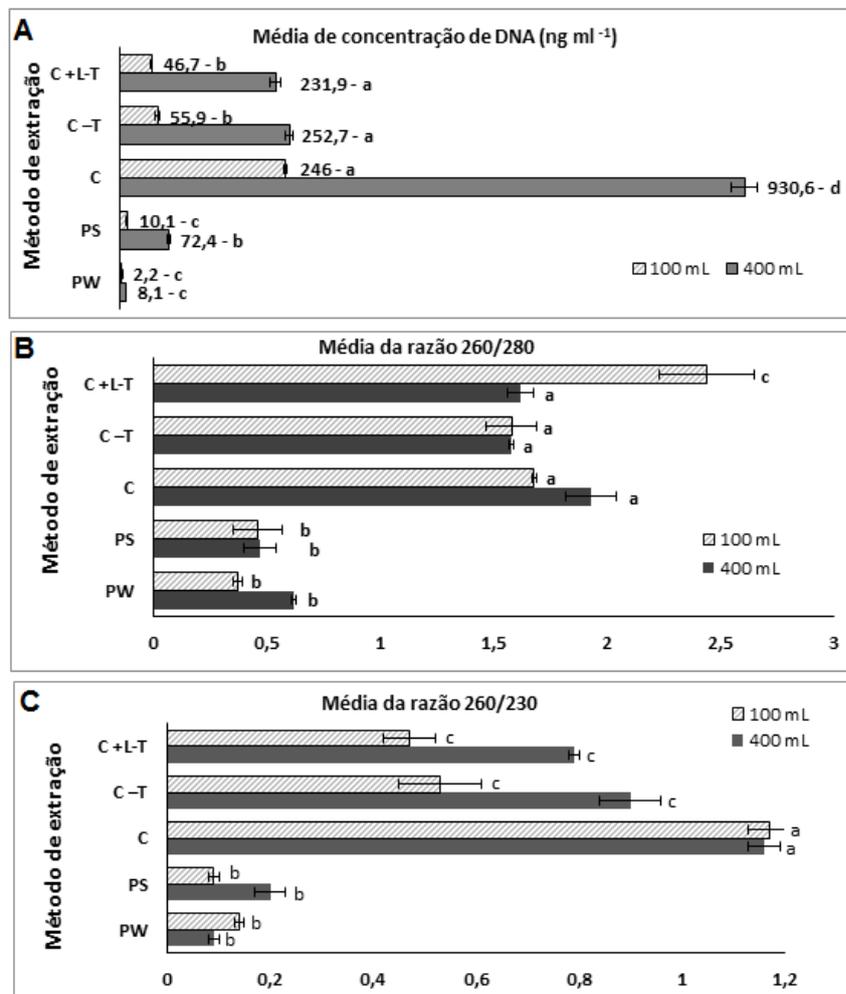


Legenda: Fotografia de Gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. **Hind:** marcador de tamanho molecular: Lambda Hind III. As demais colunas estão identificadas com o volume filtrado para realizar a extração e com as metodologias de extração: CTAB aperfeiçoado com lisozima e sem tRNA (C+L-T), CTAB aperfeiçoado sem tRNA (C-T), CTAB aperfeiçoado (C), *Power Soil* (PS) e *Power Water* (PW).

O rendimento de DNA também foi avaliado utilizando o NanoDrop e encontramos concentrações entre as metodologias, com média de $2,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (quando o DNA foi extraído pelo kit *Power Water* com 100 mL) até média com $930,6 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (extração feita pelo método CTAB aperfeiçoado com 400 mL).

O resultado da quantificação do rendimento dos métodos de extração pode ser visto na Figura 25A. Foi aplicado o teste de Tukey nestes dados e entre algumas metodologias foram vistas diferenças significativas entre os resultados. Para ilustrar essas diferenças na figura, foi colocada uma letra ao lado da concentração de DNA. Quando as letras são diferentes é porque existe diferença significativa entre os valores.

Figura 25 - Média do rendimento e pureza do DNA de água do mar das diferentes metodologias de extração



(A) Média do rendimento de DNA. (B) Média da razão $A_{260/280}$. (C) Média da razão $A_{260/230}$.

Legenda: As metodologias de extração comparadas são: CTAB aperfeiçoado com lisozima e sem tRNA (C+L-T), CTAB aperfeiçoado sem tRNA (C-T), CTAB aperfeiçoado (C), Power Soil (PS) e Power Water (PW).

Nota: As letras diferentes ao lado das barras ilustram que houve diferença significativa entre os valores quando aplicado o teste de Tukey ($P < 0,05$).

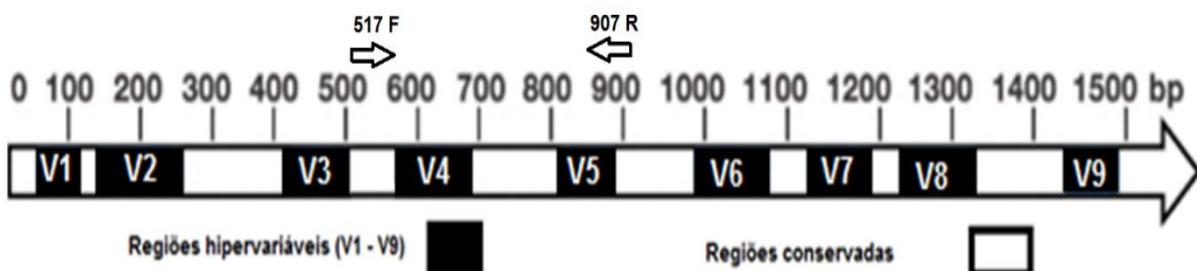
Para mensurar a pureza, usamos o NanoDrop buscando quantificar as razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$. Observamos na Figura 25B que, em relação a razão $A_{260/280}$, os valores mais distantes do indicado (entre 1,7 e 2,0) foram os obtidos pelos *kits* de extração (*Power Soil e Power Water*) e quanto à razão $A_{260/230}$ (Figura 25C), nenhuma metodologia apresentou o valor mínimo considerado ideal (maior que 1,5) (MO BIO, 2010), sendo novamente os *kits* (*Power Soil e Power Water*) as metodologias que apresentaram os piores valores. O teste de Tukey também foi aplicado nestes dados. Quando as letras que estão ao lado da barra são diferentes, existe diferença significativa entre os valores encontrados.

5.6.1 Amplificação do gene 16S RNAr

Para amplificação do gene 16S RNAr e posterior análise no DGGE foi utilizado o *primer forward* 517F com grampo GC e o *reverse* 907R (Figura 26). Estes *primers* foram escolhidos devido a alta taxa de cobertura e pela região hipervariável que eles abrangem (V4 e V5). Embora, o DNA não tenha sofrido nenhum processo de normalização, todas as amostras de DNA, nas suas diferentes concentrações e qualidade, amplificaram pela PCR o fragmento desejado (Figura 27).

Observando o resultado do gel vemos que o conjunto de primers escolhidos amplificou a região de interesse, nas condições testadas (item 4.6.4), resultando um *amplicon* de aproximadamente 400 pb. Além disso, é possível observar que não houve diferenças na intensidade da banda do *amplicon*, mesmo utilizando *templates* com diferentes características.

Figura 26 – Posição de anelamento dos primers no gene 16S RNAr



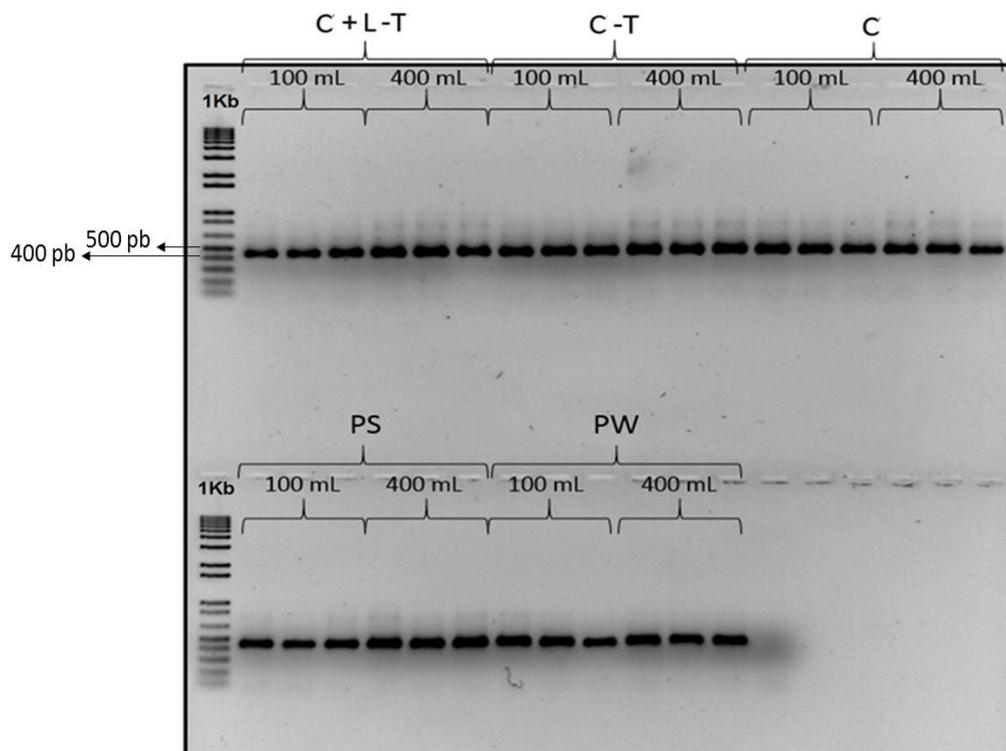
Nota: As setas a cima do gene 16S RNAr indicam a posição dos *primers* dentro do gene.

Fonte: Modificado de Cai, Archambault e Prescott (2003).

A escolha dos primers utilizados teve como base trabalhos anteriores, como o feito por Claesson et al. (2010) onde eles utilizaram dois métodos de sequenciamento de alto rendimento

(454 Titanium e Illumina) para comparar 6 pares de *primers* para as regiões hipervariáveis (i) V1 e V2, ii) V2 e V3, iii) V3 e V4, iv) V4 e V5, v) V5 e V6, vi) V7 e V8. A conclusão deste trabalho foi que a região hipervariável que apresenta a melhor performance para analisar a composição da comunidade microbiana é a V4 e V5. Resultados semelhantes também foram vistos com a metodologia do DGGE, em que o número de bandas observada no perfil do gel foi maior para as regiões V3, V4 e V5 do que para as regiões V6, V7 e V8, refletindo assim a menor variabilidade dos *amplicons* originados destas regiões (PITERINA; PEMBROKE, 2013).

Figura 27 – Amplificação do gene 16S RNAr com *template* de diferentes metodologias de extração



Legenda: Fotografia de Gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. 1Kb (Invitrogen, Pleasanton, CA, USA) marcador de tamanho molecular. As demais colunas estão identificadas com o volume filtrado para realizar a extração e com as metodologias de extração: CTAB aperfeiçoado com lisozima e sem tRNA (C+L-T), CTAB aperfeiçoado sem tRNA (C-T), CTAB aperfeiçoado (C), Power Soil (PS) e Power Water (PW).

A escolha do primer para as regiões V4-V5 se baseou no trabalho de Wang e Qian (2009), onde foi feito um estudo analisando, *in silico*, a taxa de cobertura de diferentes *primers*, dentre eles o 517F e 907R. Em seus resultados, foi observado que estes *primers* apresentaram uma taxa de cobertura maior que 97% para as 275.057 sequências de eubactérias com que foi realizada a comparação.

5.6.2 Análise do perfil do DGGE gerado pelas diferentes metodologias de extração

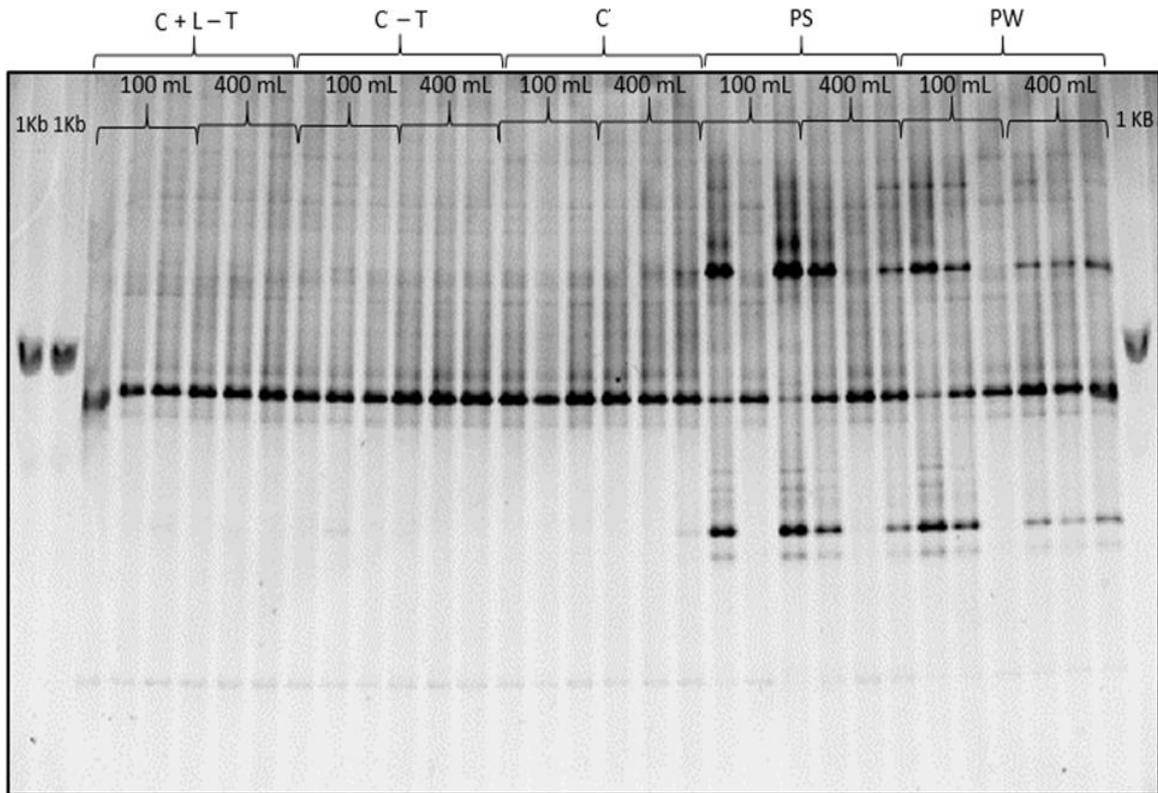
A técnica do DGGE separa fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com diferentes composições dos nucleotídeos, gerando um perfil de bandas. É um método molecular qualitativo e semi-quantitativo, sendo respectivamente influenciado pelo número de bandas e intensidade destas. No gel, cada banda representa uma espécie, ou melhor, a população desta, uma vez que a banda é formada pelo conjunto de várias sequências, e o perfil da canaleta (todas as bandas) representa a comunidade.

Neste estudo, realizamos o DGGE com o DNA extraído por diferentes metodologias para comparar o perfil de uma comunidade de bactéria do ambiente marinho. O resultado do perfil gerado pelas metodologias, estão representados na Figura 28. Nesta, é possível observar que os métodos influenciaram na composição da comunidade bacteriana observada, não somente em relação a presença e ausência das bandas de DNA, mas também em relação a sua intensidade relativa. Utilizando esta figura foram feitos dendrogramas, análises de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), diagramas de Venn e cálculos da riqueza e do índice de diversidade.

É importante deixar claro que também existem alguns entraves quando utilizamos o DGGE. Por exemplo, um micro-organismo pode apresentar múltiplas cópias do operon do gene RNAr e, assim, pode produzir mais de uma banda no DGGE (CILIA; LAFAY; CHRISTEN, 1996; NÜBEL et al., 1996; RAINEY, et al., 1996), ou, ainda as sequências do gene 16S RNAr de diferentes espécies, apesar de serem diferentes, podem não se separar no gel (VALLAEYS et al., 1997). Além disso, utilizando o DGGE conseguimos detectar sequências de organismos que estejam em concentração maiores de 1%, particularidade esta que deixa a técnica limitada, pois a maioria da população presente na comunidade pertence a poucas espécies e a maioria das espécies diferentes é composta por uma pequena minoria dentro da população (CURTIS; SLOAN, 2005). Portanto, o padrão de bandas obtido no DGGE reflete apenas os táxons mais abundantes de uma comunidade microbiana e não a diversidade completa (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

De qualquer maneira, como esses vieses atuaram da mesma forma nas diferentes metodologias de extração, eles não atrapalharam o propósito da pesquisa.

Figura 28 - Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) das diferentes metodologias de extração

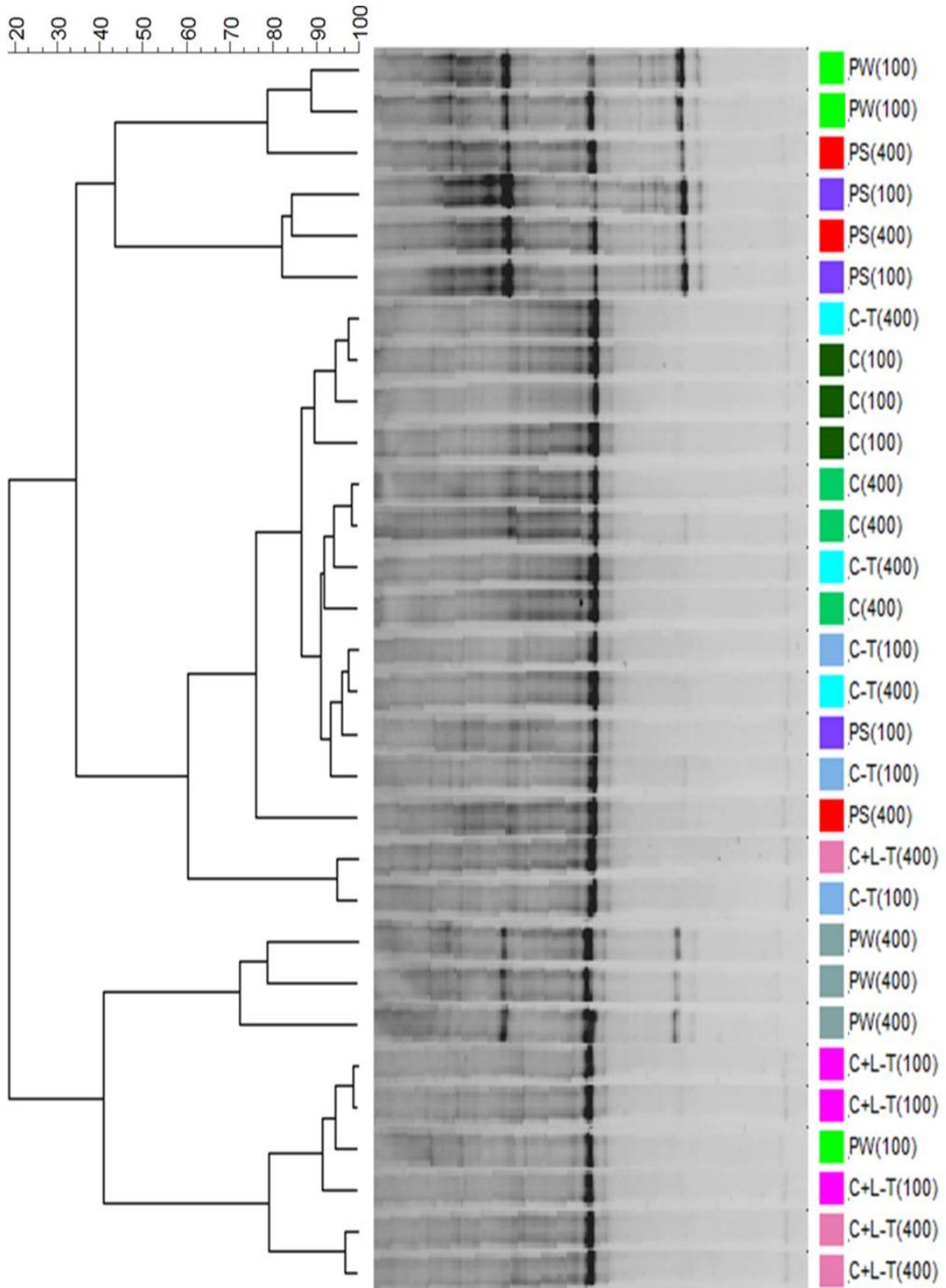


Legenda: Gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (45 a 65%) mostrando o perfil das comunidades obtidas pelos diferentes métodos de extração. 1Kb: marcador de tamanho molecular. As demais colunas estão identificadas com os produtos da PCR das metodologias de extração: CTAB aperfeiçoado com lisozima e sem tRNA (C+L-T), CTAB aperfeiçoado sem tRNA (C-T), CTAB aperfeiçoado (C), Power Soil (PS) e Power Water (PW).

O resultado do perfil do DGGE foi transformado em um dendrograma utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo de agrupamento por média aritmética não ponderada (UPGMA) (Figura 29). Observando este, é possível verificar que a maior similaridade entre as comunidades está entre as triplicatas das metodologias, uma vez que na maior parte dos agrupamentos as replicatas das metodologias se encontram nos ramos mais próximos.

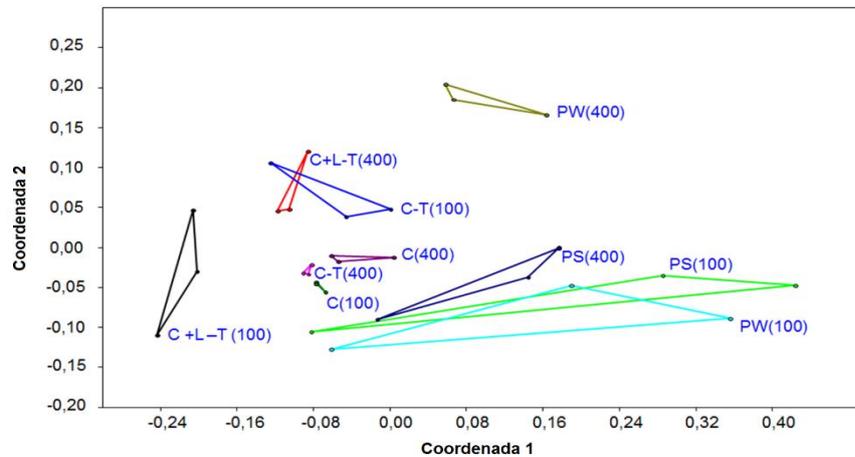
A foto do perfil do DGGE também foi usada para realizar a NMDS, utilizando o coeficiente de dissimilaridade de Bray-Curtis (Figura 30). Este resultado facilita a visualização dos resultados, de modo que simplifica o complexo perfil gerado pelo DGGE em pontos plotados dentro de um gráfico. Para interpretá-lo, considera-se a distância entre os pontos: quanto mais próximos, maior é a similaridade entre eles.

Figura 29 - Estrutura da comunidade bacteriana marinha, por DGGE, utilizando DNA extraído por diferentes metodologias



Legenda: Análise de agrupamento do padrão de bandas de DGGE utilizando a análise UPGMA e o coeficiente de correlação de Pearson das diferentes metodologias de extração: CTAB aperfeiçoado com lisozima e sem tRNA (C+L-T), CTAB aperfeiçoado sem tRNA (C-T), CTAB aperfeiçoado (C), Power Soil (PS) e Power Water (PW).

Figura 30 - NMDS comparando os perfis gerados no DGGE a partir de DNA extraído por diferentes metodologias



Nota: Pontos plotados dentro de um gráfico bidimensional baseando-se no coeficiente de dissimilaridade de Bray-Curtis. Valor de stress = 0,16.

Observando o resultado da análise NMDS gerada é possível verificar que os pontos ficaram separados no espaço plotado, e como cada ponto representa o perfil de uma comunidade, pode-se afirmar que as metodologias diferiram entre si, indicando a distinta sensibilidade na detecção das bactérias. Leite et al. (2014) demonstraram que a escolha do protocolo de extração é uma etapa crítica no estudo da ecologia microbiana. Neste trabalho, assim como o de Martin-Laurent et al. (2001), De Liphay et al. (2004) e Carrigg et al. (2007) foi observado que o perfil da comunidade microbiana, quando analisado por DGGE, foi afetado quando DNA provenientes de diferentes métodos de extração foram utilizados.

A importância dos protocolos de extração tem sido notificada, mas deveria ganhar mais atenção. Da mesma forma que obtivemos diferentes resultados na análise da diversidade de bactérias marinhas pelo gene 16S RNAr, pode ser que a procura por genes de interesse biotecnológico também seja afetada de acordo com o método de extração de DNA escolhido.

As razões para os métodos de extração resultarem em distintos perfis de bandas no DGGE podem ser divididas em não relacionadas e relacionadas diretamente com a reação em cadeia da polimerase.

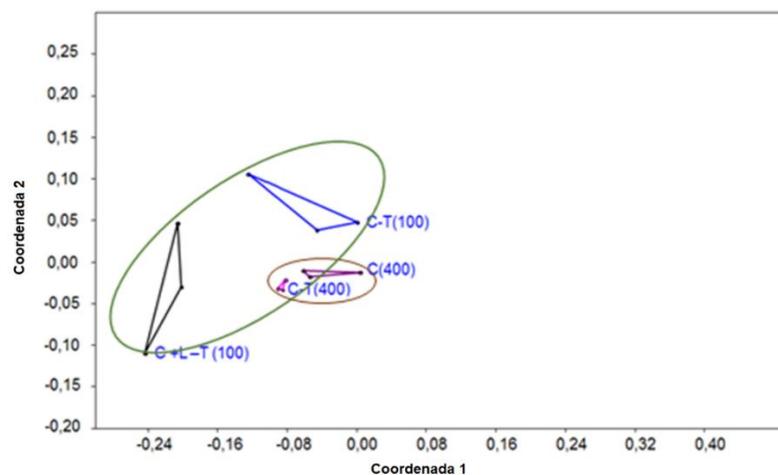
A razão não relacionada com a PCR é a lise celular. As bactérias não respondem da mesma forma quanto a ruptura da célula, pois entre os grupos taxonômicos existem variações na sua estrutura (SCHLEIFER; KANDLER, 1972), fazendo com que respondam distintamente aos métodos de lise celular (CABEEN; WAGNER, 2005). Devido esta diferença é desafiador conseguir extrair o DNA dos micro-organismos de amostras ambientais e, por isso, podemos

atribuir como uma das hipóteses para a diferença no padrão de bandas do DGGE a lise diferenciada dos micro-organismos. Esta etapa é crítica nos estudos da diversidade que utilizam diretamente o material genético dos micro-organismos, pois se for insuficiente ou preferencial para alguns organismos o resultado observado não será o verdadeiro.

A causa diretamente relacionada com a PCR, é a amplificação diferenciada do DNA. Em nosso estudo, apesar da reação de PCR ter funcionado uniformemente com DNA extraído de todas as metodologias, diferentes situações podem ter ocorrido até chegar ao *amplicon* final, uma vez que distintas razões $A_{260/280}$ e $reA_{260/230}$ e concentrações de DNA foram utilizadas nas reações. A partir do momento que usamos diferentes metodologias de extração e, portanto, trabalhamos com distintos *templates*, abrimos a possibilidades para que viéses sejam vistos na reação de PCR (ARIEFDJOHAN; SAVAIANO; NAKATSU, 2010; MARTIN-LAURENT et al., 2001).

Vemos que existe uma tendência a atribuímos as diferenças encontradas no DGGE a concentração do DNA utilizado (KOZDRÓJ; VAN ELSAS, 2000; ZHAO; XU, 2012), no entanto, existem outras possibilidades. Em nosso estudo, a metodologia C-T (400) que teve média de concentração de DNA de 55,9 ng.μL e a técnica C (400) com média 930,6 ng.μL (diferenças significativas, $P < 0,05$) ficaram mais próxima no gráfico NMDS do que amostras que não variaram significativamente nos valores da concentração do DNA ($P > 0,05$), como por exemplo, C-T (100) e C+L-T (100) com 55,9 ng.μL e 46,7 ng μL respectivamente (Figura 31), demonstrando que as diferenças no perfil do DGGE vão além de valores de concentração de DNA.

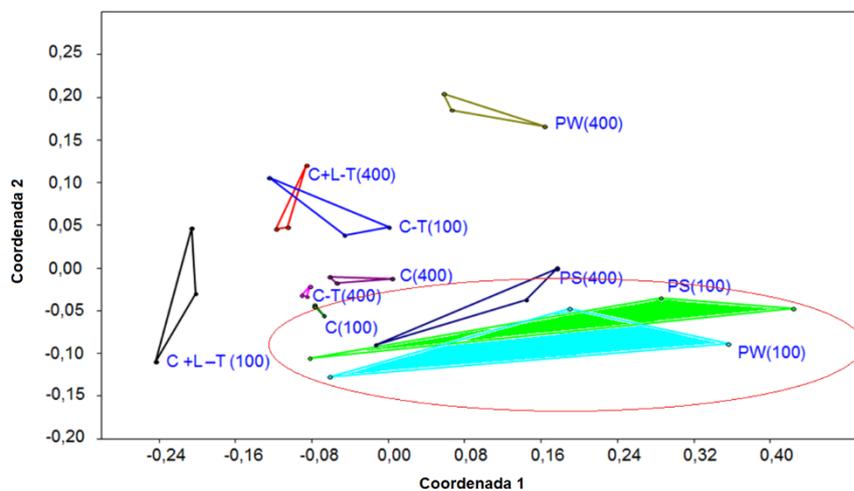
Figura 31 – NMDS comparando os perfis gerados no DGGE



Nota: As metodologias que tiveram variação significativa na concentração de DNA usada para fazer a PCR-DGGE estão representadas pelo círculo menor e o círculo maior onde não houve variação significativa.

Observamos que a escolha do método de extração do DNA é um passo crucial e que pode afetar a comunidade observada no DGGE. Em muitos estudos, utiliza-se os *kits* de extração para conseguir o DNA do ambiente, devido à praticidade, rapidez e reprodutibilidade (WILLNER et al., 2012). No entanto, vemos pela NMDS, que os pontos referentes aos *kits* (*Power Soil* e *Power Water*) que extraíram DNA a partir de 100 mL de água do mar foram as metodologias que apresentaram as maiores diferenças, entre as replicatas, no perfil do DGGE (Figura 32).

Figura 32 - NMDS destacando as metodologias que apresentaram menor reprodutibilidade nos perfis gerados no DGGE



Nota: As metodologias destacadas foram as que apresentaram a maior distância entre os pontos.

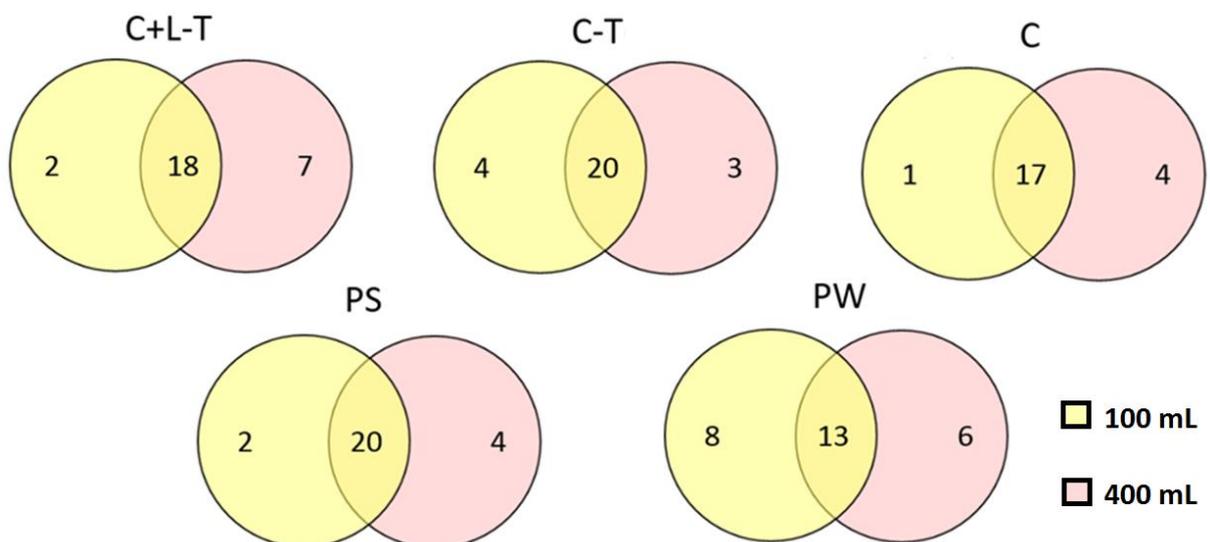
A necessidade de concentrar as bactérias presente na água do mar em uma membrana, combinada com os métodos ineficientes de extração de DNA faz com que grandes volumes de água sejam filtrados. Qian et al. (2011), Somerville et al. (1989) e Sogin et al. (2006), filtraram 1 litro de água para fazer extração do DNA do ambiente marinho, outros utilizaram ainda mais, 4 litros de água (LEE et al., 2010).

Dessa forma, para verificarmos a necessidade de utilizarmos maiores volumes de água, realizamos a extração de DNA da água do mar com cinco metodologias e com dois volumes (100 mL e 400 mL). Posteriormente, comparamos a comunidade bacteriana por DGGE, utilizando o DNA obtido por essas metodologias, levando em consideração a riqueza (número de OTU) exclusiva e compartilhada. Os diagramas foram feitos no programa Excel 2010 utilizando a matriz de presença/ausência de banda criada no Bionumerics 5.0 a partir do perfil do DGGE.

Na Figura 33 está esquematizado os diagramas de Venn das cinco metodologias com os dois volumes utilizados. Observando os diagramas vemos que a maioria das OTU são compartilhadas pelos volumes de 100 mL e 400 mL e que os OTU exclusivos são vistos hora no volume de 100 mL e hora no de 400 mL.

No trabalho de Long e Azam (2001), foi avaliado, por DGGE, se a riqueza e composição de bactérias do ambiente marinho variavam quando usado 1 μ L, 1 mL e 1 L para extrair o DNA. Eles observaram que o padrão de bandas não variou significativamente entre os volumes. Resultados semelhantes também foram encontrados por Kirchman et al. (2001), os quais não viram diferenças significativas no padrão do DGGE quando utilizado DNA extraído a partir de pequenos volumes de água do mar (< 10 mL) e grandes volumes 2 L.

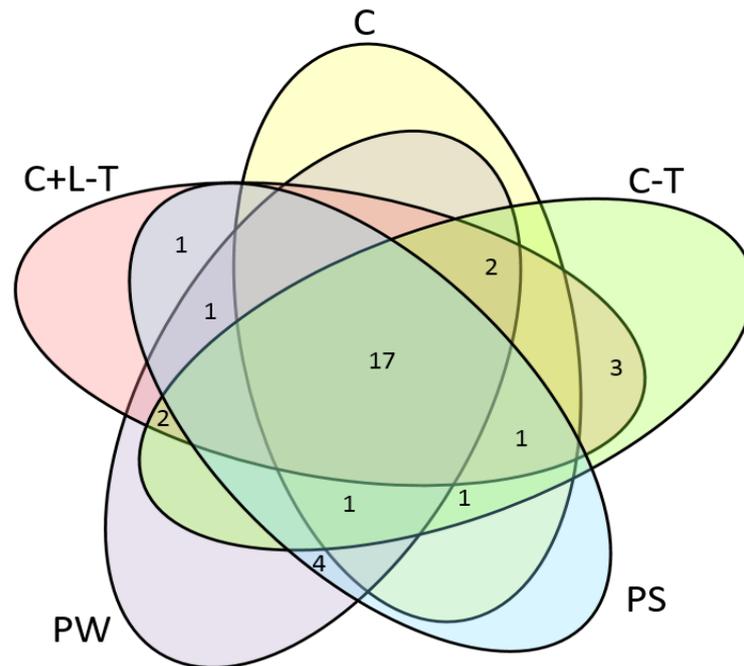
Figura 33 - Diagramas de Venn comparando as OTUs das extrações realizadas com 100 mL e 400 mL



Legenda: Diagrama de Venn representando o número de OTU exclusivas e compartilhadas das metodologias de extração: CTAB aperfeiçoado com lisozima e sem tRNA (C+L-T), CTAB aperfeiçoado sem tRNA (C-T), CTAB aperfeiçoado (C), Power Soil (PS) e Power Water (PW).

Em nossas amostras, a maioria dos representantes da comunidade foi observada em todas as técnicas de extração (Figura 34). No entanto, alguns taxa microbianos foram observados em apenas determinadas metodologias, mostrando que o método pode favorecer a extração de DNA de algumas espécies, ou seja, a escolha do método de extração pode influenciar a composição da comunidade bacteriana marinha, quando analisada por DGGE.

Figura 34 - Diagramas de Venn referente aos números de OTUs das cinco metodologias de extração



Nota: Diagrama de Venn representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre as cinco metodologias

Os cinco métodos de extração foram ainda comparados utilizando a riqueza de Chao e o índice de diversidade de Shannon e Wiener, os quais foram calculados a partir da matriz de ausência/presença e intensidade das bandas do DGGE. No cálculo da riqueza é necessário apenas somar o número de bandas no gel, uma vez que elas representam o número de filótipos e para o índice de diversidade, considera-se a riqueza e a distribuição do número de indivíduos desses diferentes filótipos (equitatividade) (WALKER, 1989).

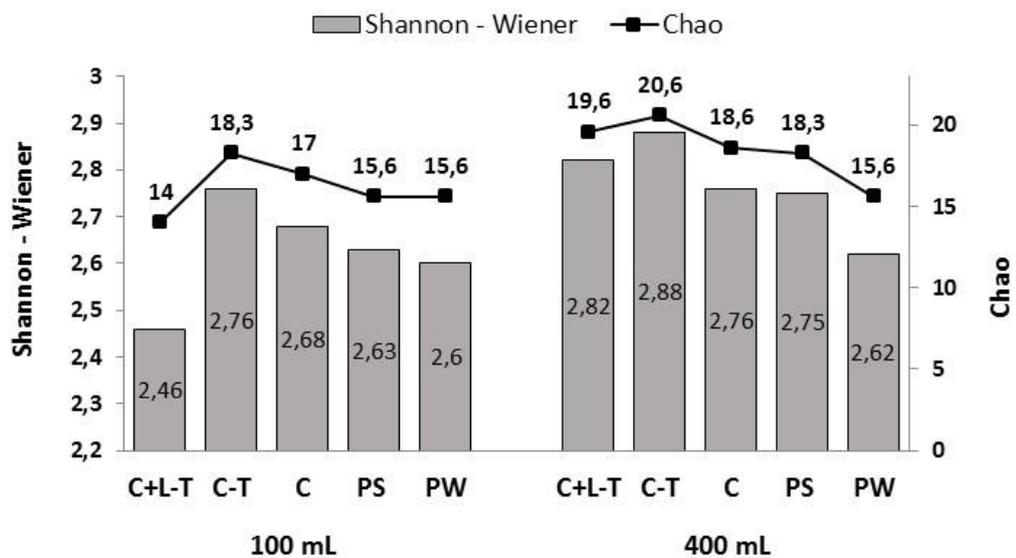
Em nosso estudo a metodologia de extração que continha lisozima (C+L-T) não teve o aumento no número de OTU como esperávamos. No trabalho De Liphay et al. (2004) foi avaliado o efeito de diferentes protocolos de extração de DNA na detecção da composição da comunidade bacteriana de solo, por DGGE, e foi visto que a extração que continha tratamento com lisozima reduziu significativamente o número de bandas obtidos no DGGE.

Leite et al. (2014), compararam diferentes protocolos de extração analisando a qualidade da extração e o perfil microbiano gerado por DGGE. Eles observaram que os perfis das comunidades microbianas foram altamente afetados pela pureza e rendimento das amostras de DNA, sendo que o método mais eficaz em relação a pureza e rendimento do DNA obtido foi o que apresentou o mais complexo perfil microbiano gerado pelo DGGE. No entanto, no trabalho de Zhao e Xu (2012) que comparou diferentes metodologias de extração de DNA de solo, o

maior número de bandas no DGGE foi visto na metodologia de extração que teve o menor rendimento.

Com certeza, uma extração de DNA representativo é crucial no estudo da diversidade dos micro-organismos pelos métodos independentes de cultivo. Uma vez que, como foi visto nesse e outros trabalhos, os perfis das comunidades microbianas analisados por DGGE, foram afetados quando diferentes métodos de extração foram utilizados. No entanto, em nossos resultados não observamos relação entre qualidade/ rendimento do DNA e riqueza e/ou diversidade. Nenhuma metodologia apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os valores obtidos de riqueza e diversidade, mesmo quando comparamos os resultados obtidos pelos dois volumes utilizados para realizar a extração (Figura 35).

Figura 35 – Índice de Shannon – Wiener e Riqueza de Chao, resultante das diferentes metodologias de extração



Nota: Os valores são referentes a média das triplicatas. Não houve diferença significativa entre os valores quando aplicado a análise de variância (ANOVA).

6 CONCLUSÕES

6.1 Aperfeiçoamento de uma técnica para extrair DNA de água do mar

- Esse estudo aprimorou a metodologia de extração de DNA de água do mar descrita por Rivera et al. (2003), resultando em um protocolo que manteve a qualidade do DNA e agregando as vantagens de ser realizado em menor tempo e com maior rendimento de DNA.
- Extraíndo-se o DNA da água do mar pelo protocolo aperfeiçoado, ocorre um aumento proporcional do rendimento à medida que mais água é filtrada.
- Ao compararmos as diferentes metodologias de extração de DNA verificamos que:
 - Em relação à concentração do DNA obtido, o protocolo aperfeiçoado apresentou o melhor rendimento, sendo os *kits* comerciais os que tiveram os valores mais baixos.
 - Quanto à qualidade do DNA observada pelas razões $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$, as técnicas de Rivera et al. (2003) e o protocolo aperfeiçoado apresentaram melhores resultados que os *kits* comerciais.
 - Quanto ao tempo de execução, os *kits* comerciais são os mais rápidos (30min), no entanto, o protocolo aperfeiçoado pode ser executado em 1h e 20min, aproximadamente quatro vezes mais rápido que o inicialmente descrito (5h).

6.2 Comparação entre diferentes métodos de extração de DNA na caracterização de uma comunidade bacteriana marinha por DGGE

- O uso de distintos protocolos de extração de DNA de água do mar resultou em diferentes perfis da comunidade microbiana marinha no DGGE, não somente em relação à presença e ausência das bandas de DNA, mas também em relação à sua intensidade relativa.
- Comparando a mesma metodologia de extração de DNA pelos dois volumes utilizados (100 mL e 400 mL), observamos que a maioria das OTUs é compartilhadas e as exclusivas são vistas tanto no volume menor como no maior.

➤ A maioria das OTUs observadas foi encontrada em todas as metodologias de extração. No entanto algumas foram observadas em apenas determinadas metodologias, corroborando com o fato já conhecido de que as técnicas de extração podem favorecer a detecção de algumas espécies.

➤ Mesmo utilizando metodologias de extração que resultaram em DNA com distintas concentrações e qualidades, não observamos diferenças significativas de riqueza e diversidade entre as metodologias testadas.

REFERÊNCIAS*

- AB´SABER, N. A. **O Litoral do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Metalivros, 2005. 281 p.
- AGOGUÉ, H.; BRINK, M.; DINASQUET, J.; HERNDL, G. J. Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. **Nature**, v. 456, p. 788-791, 2008.
- AHMAD, S. M.; GANAIE, M. M.; QAZI, P. H.; VERMA, V.; BASIR, S. F.; QAZI, G. N. Rapid DNA isolation protocol for angiospermic plants. **Bulg. J. Plantphysiol.**, v. 30, n. 1-2, p. 25-33, 2004.
- ALEKSIC, J. M.; STOJANOVIC, D.; BANOVIC, B.; JANCIC, R. A Simple and Efficient DNA Isolation Method for *Salvia officinalis*. **Biochem. Genet.**, v.50, p. 881-892, 2012.
- ALLERS, A.; WRIGHT, J. J.; KONWAR, K. M.; HOWES, C. G.; BENEZE, E.; HALLAM, S. J.; SULLIVAN, M. B. Diversity and population structure of Marine Group A bacteria in the Northeast subarctic Pacific Ocean. **ISME J.**, v. 7, n. 2, p. 256-268, 2013.
- ALMEIDA, B. C. **Diversidade de bactérias em amostras de água do mar no canal de São Sebastião**. 2009. 198 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ALVES, F.; KÖCHLING, T.; LUZ, J.; SANTOS, S. M.; GAVAZZA, S. Water quality and microbial diversity in cisterns from semiarid areas in Brazil. **Journal of Water and Health**, Jan. 2014. Disponível em: < <http://www.iwaponline.com/jwh/up/wh2014139.htm>> Acesso em: 21 jun. 2014.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ARAVINDRAJA. C.; VISZWAPRIYA, D.; KARUTHA, P. S. Ultradeep 16S RNAr Sequencing Analysis of Geographically Similar but Diverse Unexplored Marine Samples Reveal Varied Bacterial Community Composition. **Plos one**, v. 8, n. 10, p. e76724, 2013.
- ARIEFDJOHAN, M. W.; SAVAIANO, D. A.; NAKATSU, C. H. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. **Nutr. J.** v. 9, n. 23, May, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492702> >/. Acesso em 20 Jun. 2014.
- AZAM, F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. **Science**, v. 280, p. 694–696, 1998.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 3. ed. Campinas: Unicamp, 2007. 97 p.

BILGIN, D. D.; DeLUCIA, E. H.; CLOUGH, S. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. **Nat. Protoc.**, v. 4, n. 3, p. 333-340, 2009.

BOSTRÖM, K. H.; SIMU, K.; HAGSTRÖM, Å.; RIEMANN, L. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. **Limnol. Oceanogr.**, v. 2 p. 365–373, 2004.

BÜRGMANN, H.; PESARO, M.; WIDMER, F.; ZEYER, J. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. **J. Microbiol. Meth.**, v. 45, p. 7-20, 2001.

CABEEN, M. T.; WAGNER, C. J. Bacterial cell shape. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 601-610, 2005.

CAI, H.; ARCHAMBAULT, M.; PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 15, p. 465-469, 2003

CARLOS, C.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Sci. Rep.**, v. 3, p. 1624 – 1631, 2013.

CARRIGG, C.; RICE, O.; KAVANAGH, S.; COLLINS, G.; O'FLAHERTY, V. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 77, p. 955–964, 2007.

CHEN, T.; WANG, M.; LI, S.; WU, Q.; WEI, H. Molecular Identification of Microbial Community in Surface and Undersurface Douchi During Postfermentation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. 653-658, 2014.

CILIA, V.; LAFAY, B.; CHRISTEN, R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. **Mol. Biol. Evol.**, v. 13, p. 451-461, 1996.

CLAESSON, M. J.; WANG, Q.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; COLE, J.R.; O'TOOLE, P.W. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S RNAr gene regions. in: **Nucleic Acids Res.** v. 38, n. 22, p. e200, 2010.

CLEMENTINO, M. M.; FERNANDES, C. C.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; POLYCARPO, C. R.; MARTINS, O. B. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, n. 1, p. 141-51, 2007.

COLWELL, R. R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18 p. 302-307, 1997.

CORINALDESI, C.; DANOVARO, R.; DELL'ANNO A. Simultaneous Recovery of Extracellular and Intracellular DNA Suitable for Molecular Studies from Marine Sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 1, p. 46-50, 2005.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Microbiology. Exploring microbial diversity – a vast below. **Science**, v. 309, p. 1331-1333, 2005.

CURY, J. C.; ARAUJO, F. V.; COELHO-SOUZA, S. A.; PEIXOTO, R. S.; OLIVEIRA, J. A. L.; SANTOS, H. F.; DÁVILA, A. M. R.; ROSADO, A. S. Microbial Diversity of a Brazilian Coastal Region Influenced by an Upwelling System and Anthropogenic Activity. **Plos one**, v. 6, n. 1, p. e16553, 2011.

DAN, D.; ZHANG, D.; LIU, W.; LU, C.; ZHANG, T. Diversity Analysis of Bacterial Community from Permafrost Soil of Mo-he in China. **Indian J. Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 111-113, 2014.

DANIEL, I.; OGER, P.; WINTER, R. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, p. 858-875, 2006.

DE CORTE, D.; YOKOKAWA, T.; VARELA, M. M.; AGOGUÉ, H, G. J. Spatial distribution of Bacteria and Archaea and *amoA* gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea. **ISME J.**, v. 3, p. 147–158, 2009.

De LIPTHAY, J. R.; ENZINGER, C.; JOHNSEN, K.; AAMAND, J.; SORENSEN, S. J. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Biol Biochem.**, v. 36, n. 10, p. 1607-1614, 2004.

DÍEZ-VIVES, C.; GASOL, J. M.; ACINAS, S. G. Evaluation of Marine Bacteroidetes-Specific Primers for Microbial Diversity and Dynamics Studies. **Microb. Ecol.**, v. 64, n. 4, p. 1047 – 1055, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 191, p. 11-15, 1987.

DRAGO, L.; TOSCANO, M.; RODIGHIERO, V.; DE VECCHI, E.; MOGNA, G. Cultivable and pyrosequenced fecal microflora in centenarians and young subjects. **J Clin Gastroenterol.**, v. 46, p. 81-84, 2012.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; RICE, E.W.; GREENBERG, A. E.; FRANSON, M. A. H. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington: American Public Health Association, 2005. 1368 p.

EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H. D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **Eur. J. Biochem.**, v. 47, p. 91-97, 1974.

EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLÖCKNER, F.O.; AMANN, R. Culturability and In Situ Abundance of Pelagic Bacteria from the North Sea. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 7, p3044-3051, 2000.

FEINSTEIN, L.M.; SUL, W. J.; BLACKWOOD, C.B. Assesment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75. n. 16, p. 5428-5233, 2009.

FERRER, M.; BELOQUI, A.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Metagenomics for mining new genetic resouces of microbial communities. **J.Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 16, p. 109-123, 2009.

FINLAY, B. J.; MABERLY, S. C.; COOPER, J. I. Microbial diversity and ecosystem function. **Oikos.**, v. 80, p. 209-213, 1997.

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophore- sis. **Cell**, v. 16, n. 1, p. 191–200, 1979.

FRIAS-LOPEZ, J.; SHI, Y.; TYSON, G. W.; COLEMAN, M. L.; SCHUSTER, S. C.; CHISHOLM, S. W. Microbial community gene expression in ocean surface waters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 105, p. 3805–3810, 2008.

FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAIN-MISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. **Environ. Microbiol.**, v. 4, p. 634-643, 2002.

FUHRMAN, J. A.; COMEAU, D. E.; HAGSTROM, A.; CHAN, A. M. Extraction from Natural Planktonic Microorganisms of DNA Suitable for Molecular Biological Studies. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, n. 6, p. 1426-1429, 1988.

GANESH, S.; PARRIS, D. L.; DeLONG, E.; STEWART, F. J. Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. **ISME J.**, v. 8, p. 187-211, 2013.

GARBOR, E. M.; VRIES, E. J. de, JANSSEN, D. B. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 44 p. 153 – 163, 2003.

GIVENS, C. E.; BOWERS, J. C.; DEPAOLA, A.; HOLLIBAUGH, J. T.; JONES, J. L. Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*-potential roles for fish, oyster, sediment and water. **Appl. Microbiol.**, v. 58, n. 6, p. 503-10, 2014.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontol. Electron.**, v.4, n.1, p.1-9, May., 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em 15 Jul. 2014.

HARDOIM, C. C. P.; COSTA, R.; ARAÚJO, F. V.; HAJDU, E.; PEIXOTO, R.; LINS, U.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D. Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 10, p. 3331- 3343, 2009.

HARPER, J. L.; HAWKSWORTH, D. L. Preface. In: HAWKSWORTH, D.L. Biodiversity, Measurement and Estimation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 29, n. 45 p. 5-12, 1994.

HARRINGTON, C.; DEL CASALE, A.; KENNEDY, J.; NEVE, H.; PICTON, B. E.; MOOIJ, M. J.; O'GARA, F.; KULAKOV, L. A.; LARKIN, M. J.; DOBSON, A. D. Evidence of bacteriophage-mediated horizontal transfer of bacterial 16S RNAr genes in the viral metagenome of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. **Microbiology**, v. 158, p. 2789-2795, 2012.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N.: **Ainsworth & Bibsy's. Dictionary of the Fungi**. 8. ed. Oxon: C.A.B. International Wallingford, 1995. 771 p.

HENDERSON, G.; COX, F.; KITTELMANN, S.; MIRI, V. H.; ZETHOF, M.; NOEL, S. J.; WAGHORN, G. C.; JANSSEN, P. H. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. **Plos one**, v. 8, n. 9, p. e74787, 2013.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: ELSAS, J.D.V.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Ed.) **Modern Soil Microbiology**, New York: Marcel Dekker, 1997, p. 353-373.

HUNTER-CEVERA J. C. The value of microbial diversity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 278-285, 1998.

HUNTER-CEVERA, J.; KARL, D.; BUCKLEY, M. **A Report from the American academy of microbiology marine microbial diversity: the key to earth's hability**. Washington, American Academy of Microbiology, 2005. Disponível em: <<http://academy.asm.org/images/stories/documents/marinemicrobialdiversity.pdf>>. Acesso em: 26/02/2015.

HURT, R. A.; QIU, X.; WU, L.; ROH, Y.; PALUMBO, A. V.; TIEDJE, J. M.; ZHOU, J. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 10, p. 4495-4503, 2001.

INCEOGLU, Ö.; HOOGWOUT, E. F.; HILL, P.; ELSAS, J.D.V. Effect of DNA Extraction Method on the Apparent Microbial Diversity of Soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 10, p. 3378-3382, 2010.

JOLLÈS, P. Recent development in the study of lysozymes. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 3, p. 28-36, 1964.

KENNEDY, N. A.; WALKER, A.W.; BERRY, S. H.; DUNCAN, S. H.; FARQUARSON, F. M.; LOUIS, P.; THOMSON, J. M.; SATSANGI, J.; FLINT, H. J.; PARKHILL, J.; LEES, C. W.; HOLD, G. L. The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S RNAr Gene Sequencing. **Plos one**, v. 9, n. 2, p. e88982. 2014.

KIRCHMAN, D. L.; YU, L.; FUCHS, B. M.; AMANN, R. Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. **Aquat. Microb. Ecol.**, v. 26, n. 1, p. 13-22, 2001.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil

- DNA used for microbial community fingerprinting. **Biol. Fert. Soils.**, v. 31, n. 5, p. 372-378, 2000.
- LANE, D. J. 16S/23S RNAr sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; OODFELLOW, M. 1. Ed. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991. 115–163 p.
- LEAR, G.; DONG, Y.; LEWIS, G. Microbiol. Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 567-571, 2010.
- LEE, O. O.; WANG, Y.; YANG, J.; LAFI, F. F.; AL-SUWAILEM, A.; QIAN, P-Y. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. **ISME J.**, v. 4, p. 650-664, 2010.
- LEFF, L. G.; DANA, J. R.; McARTHUR, J. V.; SHIMKETS, L. J. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 1141-1143, 1995.
- LEITE, D. C. A.; BALIEIRO, F. C.; PIRES, C. A.; MADARI, B. E.; ROSADO, A. S.; COUTINHO, H. L. C.; PEIXOTO, R. Comparison of DNA extraction protocols for microbial communities from soil treated with biochar. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 45, n. 1, Apr., 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822014000100023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 19 Aug. 2014.
- LEKUNBERRI, I.; GASOL, J. M.; ACINAS, S. G.; GÓMEZ-CONSARNAU, L.; CRESPO, B. G.; CASAMAYOR, E. O.; MASSANA, R. PEDRÓS-ALIÓ, C.; PINHASSI, J. The phylogenetic and ecological context of cultured and whole genome-sequenced planktonic bacteria from the coastal N W Mediterranean Sea, **Syst. Appl. Microbiol.**, v.37, n.3, p.216-228, 2014.
- LIU, G. X.; HU, P.; ZHANG, W.; WU, X.; YANG, X.; CHEN, T.; ZHANG, M.; LI, S. W. Variations in soil culturable bacteria communities and biochemical characteristics in the Dongkemadi glacier forefield along a chronosequence. **Folia Microbiol.**, v. 57, p. 485-494, 2012.
- LONG, R. A.; AZAM, F. Microscale patchiness of bacterioplankton assemblage richness in seawater. **Aquat. Microb. Ecol.** v. 26, p. 103-113, 2001.
- MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J. C.; SOULAS, G.; CATROUX, G. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 5, p. 2354-2359, 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 11, p. 4715-4724, 1999.
- MIRSEPASI, H.; PERSSON, S.; STRUVE, C.; ANDERSEN, L. O. B.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K. A. Microbial diversity in fecal samples depends on DNA extraction method: easyMag DNA extraction compared to QIAamp DNA stool mini kit extraction. **BMC Res Notes**, v. 7, n. 50, 2014.

MO BIO. Popular misconceptions about DNA isolation and quantification. Carlsbad. Disponível em <http://www.mobio.com/blog/2010/01/31/popular-misconceptions-about-dna-isolation-and-quantification/> >. Acesso em: 05/01/2015.

MOESENEDER, M. M.; ARRIETA, J. M.; MUYZER, G.; WINTER, C.; HERNDL, G. J. Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 8, p. 3518-3525, 1999.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B. WORM, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **Plos. Biol.**, v. 9, n. 8, p. e1001127, 2011.

MORAES, P.C. **Resposta microbiana a perturbação naturais em sedimentos costeiros**. 2012. 142 f. Tese – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 5, p. 1572-1580, 1994.

MOYER, G. R.; DÍAZ-FERGUSON, E.; HILL, J.; SHEA, C. Assessing Environmental DNA Detection in Controlled Lentic Systems. **Plos one**. v. 9, n. 7, p. e103767, 2014.

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 RNAr. **Appl. Environ. Microb.**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MYERS, R. M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC- clump can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucl. Acids Res.**, v. 13, p. 3131–3145, 1985.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 2764-2769, 1996.

NEEFS, J-M.; VAN de PEER, Y.; HENDRIKS, L.; DE WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic. Acids. Res. Suppl.**, v. 18, p. 2237-2317, 1990.

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S RNAr in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **J Bacteriol.**, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

OLIVEIRA, M. C. de S. (Coord). **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. p. 1-43, 2007. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32770/1/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso em: 04 Abr. 2013.

- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L.D.; SIMIONI, K.C.M.; NETO, E.V.S. Bacterial diversity characterization in petroleum samples from brasilian reservoirs. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p. 445-452, 2008.
- OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 40, p. 337-365, 1986.
- OSBORNE, C. A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S RNAr gene-specific primers. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 248, p. 183-187, 2005.
- OVREAS, L.; CURTIS, T. P. Microbial diversity and ecology. In: MAGURRAN, A.E.; MCGILL, B. **Biological Diversity** – frontiers in measurement and assessment. 1. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2011.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.
- PITERINA, A.V.; PEMBROKE, J. T. “Use of PCR-DGGE Based Molecular Methods to Analyse Microbial Community Diversity and Stability during the Thermophilic Stages of an ATAD Wastewater Sludge Treatment Process as an Aid to Performance Monitoring.” **ISRN Biotechnol.**, Aug., 2013. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/162645/>. Acesso em 10 Jun. 2013.
- PORTEUS, L. A.; ARMSTRONG, J. L. Recovery of Bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. **Curr. Microbiol.**, v. 22, p. 345-348, 1991.
- PUCHOOA, D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). **Afr. J. Biotechnol.**, v. 3, n. 4, p. 253-255, 2004.
- QIAN, P-Y.; WANG, Y.; LEE, O. O.; LAU, S. C. K.; YANG, J.; LAFI, F. F.; AL-SUWAILEM, A.; WONG, T. Y. H. Vertical stratification of microbial communities in the Red Sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing. **ISME J.**, v. 5, p. 507-518, 2011.
- QUERELLOU, J.(Coord). Marine Biotechnology: A New Vision and Strategy for Europe. **Marine Board-ESF.**, p. 1 – 96, 2010.
- RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; JANSSEN, P. H.; HIPPE, H.; STACKEBRANDT, E. *Clostridium paradoxum* DSM 7308(T) contains multiple 16S RNAr genes with heterogeneous intervening sequences. **Microbiology**, v. 142, p. 2087-2095, 1996.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, R. Strategies for accessing soil etagenome for desired applications. **Biotechnol. Adv.**, v. 26, p. 576-590, 2008.
- RITTMANN, B. E.; HAUSNER, M.; LÖFFLER, F.; LOVE, N. G.; WAGNER, M. A. A vista for Microbial Ecology and Environmental. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40. p. 1096-1103, 2006.
- RIVERA, I. N. G.; LIPP, E.; GIL, A.I.; CHOOPUN, N.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environ. Microbiol.**, v. 5, n. 7, p. 599 - 606, 2003.

- RIVERA, I. N. G.; PAULA, C. R.; SOUZA, C. P. Microbiologia aquática marinha. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, p. 609-627.
- RODRIGUES, C. S.; SOUZA, S. S.; REZENDE, R. P.; SILVA, A.; ANDRIOLI, J. L.; COSTA, H.; FONTANA, R.; DIAS, J. C. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for detection of bacterial and yeast communities along a salinity gradient in the estuary of the Cachoeira River in Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 12, n. 2, p. 1752 – 1760, 2013.
- ROGERS, N. L.; COLE, S. A.; LAN, H-C.; CROSSA, A.; DEMERATH, E. W. New Saliva DNA Collection Method Compared to Buccal Cell Collection Techniques for Epidemiological Studies. **Am. J. Hum. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 319-326, 2007.
- ROH, C.; VILLATE, F.; KIM, B-G.; SCHMID, R. D. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 134, p. 97–112, 2006.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotechnolog. Cienc. Desenvolv.**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.
- ROUX, S.; TOURNAYRE, J.; MAHUL, A.; DEBROAS, D.; ENAULT, F. Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 76, 2014.
- SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of Burkholderia species in soil: Effect of crop and land use history. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 vol.
- SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; LEITE, D. C. A.; JESUS, H. E.; DE CARVALHO MAALOUF, P.; ALMEIDA, C.; SORIANO, A. U.; ALTOMARI, D.; SUHETT, L.; VÓLARO, V.; VALONI, E.; FRANCISCO, M.; VIEIRA, J.; ROCHA, R.; SARDINHA, B. L.; MENDES, L. B.; JOÃO, R. R.; LACAVA, B.; JESUS, R. F.; SEBASTIAN, G. V.; PESSOA, A.; VAN ELSAS, J. D.; REZENDE, R. P.; PIRES, D. O.; DUARTE, G.; CASTRO, C. B.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Comparison of differen protocols for the extraction of microbial DNA from reef corals. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n. 2 p. 517-527, 2012.
- SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process. Biochem.**, v. 42, p. 119-133, 2007.
- SCHLEIFER, K. H.; KANDLER, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Bacteriol. Rev.**, v. 36, n. 4, p. 407-77, 1972.
- SCHLOSS, P. D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S. L. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S RNAr-Based Studies. **Plos one**, v. 6, n. 12, p. e27310, 2011.
- SCUPHAM, A. J.; JONES, J. A.; WESLEY, I. V. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, n. 2, p. 401-409, 2007.

SILVEIRA, C. B.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; PARANHOS, R.; ALBANO, R. M.; MARTINS, O. B. Influence of Salinity on Bacterioplankton Communities from the Brazilian Rain Forest to the Coastal Atlantic Ocean. **Plos one**, v. 6, n. 3, p. e17789 2011.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, n. 32, p. 12115–12120, 2006.

SOMERVILLE, C. C.; KNIGHT, I. T.; STRAUBE, W. L.; COLWELL, R.R. Simple, Rapid Method for Direct Isolation of Nucleic Acids from Aquatic Environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 3, p. 548-554, 1989.

STACH, J. E. M.; BATHE, S.; CLAPP, J. P.; BURNS, R.G. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 36, p. 139-151, 2001.

STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. **Proc. Biol. Soc. Wash.**, v. 6, p. 389-400, 1984.

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

STEFFAN, R. J.; GOKSOYR, J.; BEK, A. K.; ATLAS, R. M. Recovery of DNA from Soils and Sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, n. 12, p. 2908-2915, 1988.

SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, p. 356–361, 2005.

SWIFT, M. J.; ANDRÉN, O.; BRUSSAARD, L.; BRIONES, M.; COUTEAUX, M-M.; EKSCMITT, K.; KJOLLER, A.; LOISEAU, P.; SMITH, P. Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. **Glob. Change Biol.**, v. 4, n. 7, p. 729-743, 1998.

TANG, X.; GAO, G.; ZHU, L.; CHAO, J.; QIN, B. DNA extraction procedure affects organic-aggregate-attached bacterial community profiles from a shallow eutrophic lake. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 776-782, 2009.

TAPPEH, K. H.; HANIFIAN, H.; DIBA, K. Comparison of Four Methods for DNA Extraction From *Echinococcus granulosus* Protoscoleces. **Turkiye Parazitol. Derg.**, v. 36, p. 100-104, 2012.

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. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 59, p. 2657–2665, 1993.

THERMO-SCIENTIFIC. **260/280 and 260/230 Ratios**. T042-Technical Bulletin. Wilmington, Delaware - USA, 2009. Disponível em:

<<http://www.phenogenomics.ca/transgenics/docs/NanoDrop%20Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>> Acesso em: 21 May, 2013

THOMPSON, C. L. Analysis of community dynamics in environmental samples using denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods Mol. Biol.**, v. 1096, p. 45-55, 2014.

TORSVIK, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil. Biol. Biochem.**, v. 12, p. 15-21, 1979.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TRIFUNAC, N. P.; KRASNA, A. I. Alterations in structure and function of transfer ribonucleic acid on chemical methylation. **Biochem.**, v. 13, n. 11, p. 2403-2409, 1974.

TSAI, Y-L.; OLSON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 2292-2295, 1992.

URAKAWA, H.; MARTENS-HABBENA, W.; STAHL, D. A. High Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea in Coastal Waters, Determined Using a Modified DNA Extraction Method. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 7, p. 2129-2135, 2010.

VALLAEYS T.; TOPP E.; MUYZER G.; MACHERET V.; LAGUERRE G.; SOULAS G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 24, p. 279-285, 1997

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 309, n. 1, p. 1-7, 2010.

WAHLBERG, K.; HUGGETT, J.; SANDERS, R.; WHALE, A. S.; BUSHELL, C.; ELASWARAPU, R.; SCOTT, D. J.; FOY, C. A. Quality Assessment of Biobanked Nucleic Acid Extracts for Downstream Molecular Analysis. **Biopreserv. Biobank.**, v. 10, n. 3, p. 266-275, 2012.

WALKER, D. Diversity and stability. In: CHERRETT, J.M., **Ecological concepts**. Oxford, Blackwell Scientific Public, p. 115 – 146, 1989.

WANG, L. Y.; QIAN, P-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S RNAr Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **Plos one**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

WANG, Q. T.; XIAO, W.; MINDRINOS, M.; DAVIS, R. W. Yeast tRNA as carrier in the isolation of microscale RNA for global amplification and expression profiling. **Biotechniques**, v. 33, p. 788-796, 2002.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WIEDENBECK, J.; COHAN, F. M. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. **Microbiol. Rev.**, v. 35, p. 957-976, 2011.

WILLNER, D.; DALY, J.; WHILEY, D.; GRIMWOOD, K.; WAINWRIGHT, C. E.; HUGENHOLTZ, P. Comparison of DNA Extraction Methods for Microbial Community Profiling with an Application to Pediatric Bronchoalveolar Lavage Samples. **Plos one**, v. 7, n. 4, p. e34605, 2012.

WINKLER, M-K. H.; KLEEREBEZEM, R.; BRUIM, L. M. M.; VERHEIJEN, P. J. T.; ABBAS, B.; HABERMACHER, J.; LOOSDRECHT, M. C. M. Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, n. 16, p. 7447-7458, 2013.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WU, J.; LIN, I-H.; HAYES, R. B.; AHN, J. Comparison of DNA Extraction Methods for Human Oral Microbiome Research. **Br. J. Med. Med. Res.**, v. 4, n. 10, p. 1980-1991, 2014.

ZHANG, W. Analysis of the archaea communities in fields with long-term continuous cotton cropping. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 13, n. 3, p. 456-464, 2014.

ZHAO, F.; XU, K. Efficiency of DNA extraction methods on the evaluation of soil microeukaryotic diversity. **Acta Ecologica Sinica**. v. 32, n. 4, p. 209-214, 2012.

ZHAO, L.; MA, T.; GAO, M.; GAO, P.; CAO, M.; ZHU, X.; LI, G. Characterization of microbial diversity and community in water flooding oil reservoirs in China. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 3039-3052, 2012.

ZHOU, J.; BRUNS, M.; TIEDJE, J. M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 316-322, 1996.

ZHOU, J.; HE, Z.; YANG, Y.; DENG, Y.; TRINGE, S. G.; ALVAREZ-COHEN, L. High-Throughput Metagenomic Technologies for Complex Microbial Community Analysis: Open and Closed Formats. **mBio.**, v. 6, n. 1, p. e02288-14, 2015.

ZHOU, M-Y.; WANG, G-L.; LI, D.; ZHAO, D-L.; QIN, Q-L.; CHEN, X-L.; CHEN, B.; ZHOU, B-C.; ZHANG, X-Y.; ZHANG, Y-Z. Diversity of Both the Cultivable Protease-Producing Bacteria and Bacterial Extracellular Proteases in the Coastal Sediments of King George Island, Antarctica. **Plos one**, v. 8, n.11, p. e79668, 2013.

ANEXO

Extração de DNA pelo método CTAB de Rivera et al., 2003.

i - Água de diluição (EATON, 2005)

Adicionar 1,25 mL de solução estoque A e 5 mL de solução estoque B para um volume de 1000 mL de água Milli-Q. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Armazenar na geladeira.

Solução estoque A: pesar 34 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e dissolver em 500 mL de água Milli-Q. Ajustar o pH para 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1000 mL com água Milli-Q. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Armazenar na geladeira.

Solução estoque B: pesar 81,1 g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e dissolver em 500 mL de água Milli-Q, completar o volume para 1000 mL com água Milli-Q. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Armazenar na geladeira.

ii - Tampão SET

20% de sacarose, 50mM de EDTA e 50mM de Tris-HCl para um volume final de 100 mL de água Milli-Q estéril, pH 7,6. Armazenar à temperatura ambiente (SOMERVILLE et al., 1989).

Solução Tris-HCl 1M, pH 8,0

Pesar 121.1 g de Tris-base e dissolver em 800 mL de água Milli-Q estéril. Ajustar o pH para 8,0 com adição de 42 mL de ácido clorídrico concentrado. Completar o volume para 1000 mL com água Milli-Q estéril. Armazenar à temperatura ambiente.

Solução EDTA 0,5M, pH 8,0

Pesar 186.1 g de EDTA, dissolver em 800 mL de água Milli-Q estéril e em seguida homogeneizar com o auxílio de um agitador magnético. Ajustar o pH para 8.0 com NaOH 10 N, e completar o volume para 1000 mL de água Milli-Q estéril. Armazenar à temperatura ambiente.

iii - Lisozima (5 mg.mL⁻¹)

Pesar 5 mg de lisozima e dilua em 1 mL de uma solução 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 10 mM NaCl. Armazenar à -20 °C (SOMERVILLE et al., 1989).

iv - SDS 10%

Pesar 10 gramas de SDS e complete o volume para 100 mL de água Milli-Q estéril. Dissolva com auxílio de um agitador magnético com aquecimento. Armazenar à temperatura ambiente.

v - Proteinase K (20 mg.mL⁻¹)

Pesar 20 mg de proteinase K e dilua em 1 mL de água Milli-Q estéril. Armazenar à -20 °C.

vi - NaCl 5M

Pesar 292.2 g de NaCl e complete o volume para 1000 mL com água Milli-Q. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente.

vii - 10% CTAB em 0.7M NaCl

Dissolver 4,1 g de NaCl em 80 mL de água Mili-Q estéril e em seguida adicionar 10 g de CTAB (*hexadecyltrimethyl ammonium bromide*) sob agitação. Se necessário, aqueça a 65 °C para dissolver completamente. Ajuste o volume final para 100 mL. Antes do seu uso recomenda-se pré-aquecer a solução a 65 °C. Armazenar à temperatura ambiente.

viii - Tampão TE - (Tris-EDTA -10 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 1 mM EDTA, pH 8.0)

10 mL de solução estoque de Tris-HCl 1M, pH 8.0 e 2 mL de solução de EDTA 0.5 M, pH 8.0, para um volume de 1000 mL de água Mili-Q estéril. Armazenar na geladeira.