

## Taxonomia de microrganismos por sequenciamento

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar isolados de fungos previamente isolados por microbiologia convencional pelo seqüenciamento da região ITS do DNA ribossômico. **MÉTODOS:** os isolados ( $n = 10$ ) foram cultivados em Sabouraud Glucose Agar, com antibióticos, a fim de evitar a contaminação bacteriana. O DNA foi isolado usando o método CTAB. O DNA obtido foi amplificado por reação de PCR, em seguida, purificado. A qualidade e a quantidade do DNA obtido foram avaliadas por eletroforese em 0,8% de gel de agarose com coloração por brometo de etídio. Finalmente, o DNA foi sequenciado. **RESULTADOS:** Todos os géis de eletroforese apresentaram os resultados esperados para a técnica aplicada. Um total de 10 isolados de fungos foram identificados após análise das sequências obtidas. **CONCLUSÕES:** o uso de ferramentas moleculares permitiu a identificação dos microrganismos estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Reação em cadeia da polimerase. Região ITS. Sequenciamento de DNA.

**Mariely Cristine dos Santos**  
[s.mariely.c@gmail.com](mailto:s.mariely.c@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Mariana Machado Fidelis do Nascimento**  
[marifideliss@gmail.com](mailto:marifideliss@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Juliana Vitória Messias Bittencourt**  
[julianavitoria@utfpr.edu.br](mailto:julianavitoria@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

## INTRODUÇÃO

De 100 milhões de organismos vivos diferentes existentes, apenas uma quantidade inferior a 10% já foi descoberta, identificada e classificada (TORTORA, CASE, FUNKE, 2016). A taxonomia abrange a classificação, nomenclatura e identificação dos organismos em grupos (VANDAMME et al., 1996).

Na classificação taxonômica de fungos, havia grande dificuldade de identificação dos microrganismos devido a classificação destes ser realizada de acordo com seus aspectos morfológicos (ARX, 1974). Estas características morfológicas, a qual distingue espécies ou gêneros muitas vezes são de difícil determinação. (GUARRO et al. 1999). O emprego de técnicas moleculares facilita a identificação e classificação de microrganismos, aumentando a velocidade em que os resultados são obtidos. Estas técnicas possuem alta sensibilidade, o que permite que sejam capazes de identificar variações mínimas existentes dentro de uma espécie de microrganismos ou em amostras individuais (CANADA, 2017).

Para a realização da PCR – Reação em Cadeia da Polimerase aplicada à caracterização de fungos, é comumente empregada a amplificação da região do Espaço Interno Transcrito (ITS) do rDNA. Em fungos, a amplificação desta região apresenta bons resultados em reações de PCR e sequenciamento. Seu uso em amplificações é vantajoso, pois se trata de uma região que permite o uso de menores quantidades de material biológico e possui maior probabilidade de sucesso na identificação de espécies estreitamente relacionadas (XU; ADAMOWICZ, 2016).

O objetivo deste trabalho foi identificar por meio sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal os fungos isolados através de microbiologia convencional.

## METODOLOGIA

**Amostragem:** Os fungos isolados foram repicados em meio Sabouraud, onde adicionaram-se os antibióticos penicilina, gentamicina e vancomicina em quantidades de 500 µL, 100 µL e 100 µL, respectivamente. Os repiques foram feitos em estriamento contínuo. As placas foram incubadas a 28°C por 5 a 7 dias. Após o período de incubação, aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> do micélio da colônia foi transferido para microtubos de PCR de volume 1,5 mL contendo tampão CTAB (300 µL) e uma mistura de sílica e celite (proporção 2:1).

**Extração de DNA:** Para a extração de DNA, seguiu-se o protocolo estabelecido por Vicente *et al.* (2008). O material foi triturado por aproximadamente 5 minutos com auxílio de pistilos de plástico esterilizados. Em seguida, adicionou-se mais 200 µL de tampão CTAB aos tubos que foram então incubados a 65°C por 10 minutos. Após a incubação adicionou-se 500 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1), e homogeneizou-se por inversão dos tubos. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos obtendo-se duas fases: aquosa e orgânica. A fase aquosa foi coletada e transferida para tubos esterilizados, acrescentando-se 800 µL de etanol 96% para a precipitação do DNA em freezer -20°C pelo período de 12 horas. Depois da precipitação do DNA, realizou-se nova centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos e todo o sobrenadante foi descartado. Na sequência, foi procedida a lavagem do DNA obtido com 1000 µL de álcool a 70% gelado. O DNA obtido teve sua qualidade e

integridade verificada em gel de agarose a 0,8% (70v por 30 minutos), corado com brometo de etídio e visualizado em Transiluminador.

**Amplificação do DNA:** Com as amostras de DNA isolado, realizou-se a reação de PCR. Os primers utilizados foram o ITS1 e ITS4. O mix usado foi calculado para o volume de 25  $\mu$ L, onde para os valores de cada reação usaram-se 14  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura, 2,5  $\mu$ L de dNTP's, 2,5  $\mu$ L de tampão Buffer 10X, 1,3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 1,3  $\mu$ L de cada primer, 0,3  $\mu$ L de Taq DNA Polimerase Platinum e, por fim 2  $\mu$ L de DNA molde. As condições de amplificação foram: 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 94°C por 45 segundos para a desnaturação, 52°C por 45 segundos para o anelamento, 72°C por 2 minutos para a extensão e 72°C por 7 minutos para a extensão final. A reação foi realizada em 35 ciclos.

Os produtos de amplificação por PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,4% (70v por 30 minutos), corado com brometo de etídio visualizado em Transiluminador.

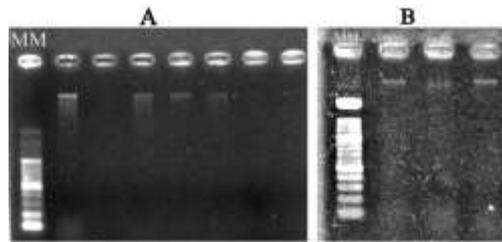
**Purificação do DNA:** Realizou-se a purificação do produto da PCR para eliminar da reação resto dos reagentes utilizados na amplificação, como por exemplo, primer e dNTP's. O protocolo de purificação foi realizado utilizando o polímero PEG (Polietilenoglicol), que foi adicionado ao microtubo da PCR em quantidade proporcional ao volume do produto da PCR (25  $\mu$ L). Em seguida, prosseguiu-se com incubação a 37°C por 30 minutos, centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos seguido de descarte do sobrenadante com auxílio de micropipeta. Ao novo tubo adicionou-se 125  $\mu$ L de etanol 80% gelado, submetendo o tubo a centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante novamente foi descartado e houve a adição de 125  $\mu$ L de etanol 96% gelado que foi retirado logo em seguida. Após evaporar o restante do etanol 96% com a ajuda do banho-seco, ressuspendeu-se o DNA purificado em 15  $\mu$ L de água ultrapura, deixando-o a 37°C por 30 minutos em banho-seco.

**Sequenciamento:** Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento na empresa Myleus Biotechnology ([www.myleus.com](http://www.myleus.com)), os quais foram preparados de acordo com as normas exigidas pela empresa. As sequências recebidas foram tratadas através do software SeqMan e, em seguida realizada comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool na página.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de extração de DNA utilizado foi eficiente na extração da maior parte das amostras. Entretanto, foi necessário repetir esta etapa para alguns dos microrganismos, visto que, não obteve-se a presença de bandas de DNA em todos os poços no gel, como observado na Figura 1. Segundo Hepp & Nonohay (2016), durante a eletroforese as moléculas presentes são separadas devido a diferença de velocidade de migração no gel.

Figura 1 – Gel de agarose a 0,8% com resultados para a presença de DNA. MM= marcador de peso molecular. A. primeira extração de DNA. B. repetição do protocolo em amostras não isoladas na primeira tentativa.

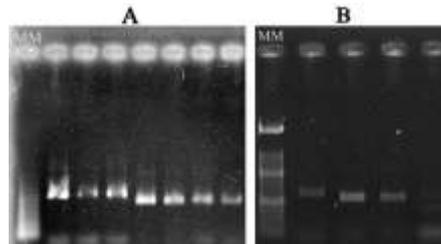


Fonte: Autoria Própria (2017).

Um DNA de boa qualidade caracteriza-se por uma banda bem definida, sem arrastes, sem a presença de RNA mais abaixo no gel e sem a presença de proteínas no poço. De acordo com a posição da banda de DNA no gel, pode-se afirmar que foram obtidas bandas com tamanho de 1500 pb.

A amplificação do DNA pela reação de PCR foi bem sucedida em todas as amostras. Entretanto, pode-se observar na Figura 2 que as bandas de PCR não ficaram bem definidas, principalmente as amplificações da primeira leva de amostras que obtiveram um claro arraste de bandas. A região amplificada foi a região ITS, considerada vantajosa na identificação de espécies e linhagens, visto que é uma região conservada intraespecificamente, mesmo apresentando variações entre espécies distintas (FUNGARO, 2000).

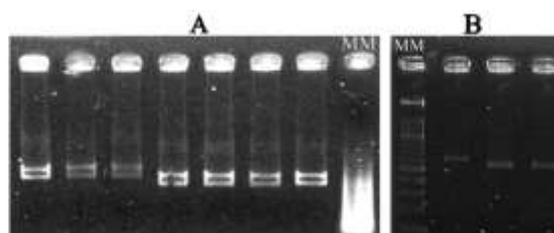
Figura 2 – Gel de agarose a 1,4% com resultados para a amplificação do DNA. MM= marcador de peso molecular. A. amplificação das amostras primeiramente isoladas. B. amplificação das amostras isoladas na segunda tentativa.



Fonte: Autoria Própria (2017).

Percebe-se também a presença de restos de reagentes do mix do PCR na parte inferior do gel. Em casos como este, onde a amplificação apresentou contaminantes alheios a banda de interesse faz-se necessário realizar uma purificação, de modo a evitar ruídos e erros que podem aparecer em análises posteriores, como a de sequenciamento (UNIVERSITY OF ALBERTA [200-?]). O reagente utilizado para a purificação foi o PEG 8000, capaz de solubilizar os outros contaminantes, deixando um DNA mais puro, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 – Gel de agarose a 1,4% com resultados para a purificação dos produtos da PCR. MM= marcador de peso molecular. A. purificação das amostras primeiramente isoladas. B. purificação das amostras isoladas na segunda tentativa.



Fonte: Autorial Própria (2017).

Com o resultado do sequenciamento foi possível obter a identificação das 10 amostras. O eletroferograma resultante apresentou boa qualidade em geral e baixa concentração de ruídos, demonstrando a eficiência da purificação.

### **CONCLUSÃO**

As técnicas moleculares provaram-se eficientes para a identificação dos fungos estudados. Os equipamentos devem estar bem calibrados de modo a evitar erros de resultados.

## Taxonomy of microorganisms by sequencing

### ABSTRACT

The aim of this work was to identify fungal isolates previously isolated by conventional microbiology by the sequencing of the ITS region of ribosomal DNA. **METHODS:** The isolates (n=10) were cultured in Sabouraud Glucose Agar, with antibiotics in order to avoid bacteria contamination. The DNA was isolated using CTAB method. The obtained DNA was amplified by PCR reaction then purified. The quality and amount of the DNA obtained were evaluated by electrophoresis on 0,8% agarose gel with coloration by bromide ethidium. Finally, the DNA was sequenced. **RESULTS:** All the electrophoresis gels presented the expected results for the applied technique. A total of 10 fungal isolates were identified after analysis of the obtained sequences. through the files that were sent back by the sequencing company. **CONCLUSIONS:** The use of molecular tools allowed the identification of the studied microorganisms.

**KEYWORDS:** DNA Sequencing. ITS Region. Polymerase Chain Reaction.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro recebido para desenvolvimento desta pesquisa.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa por ceder as instalações e equipamentos necessários para a realização das análises.

## REFERÊNCIAS

ARX, J.A. von. 1974. The Genera of Fungi Sporulating in pure culture. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 351p.

CANADA. T-4-126 – Identification and taxonomic classification of microorganism(s) represented for use as supplements under the Fertilizers Act. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/plants/fertilizers/trade-memoranda/t-4-126/eng/1346524491267/1346527009874>>. Acesso em: 11 ago. 2017.

FUNGARO, M.H.P. PCR na Micologia. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.14, p. 12-16, 2000.

GUARRO, J., GENE', J. STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. Clinical Microbiology Reviews, 12: 454–500, 1999.

HEPP, D., NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS – Campus Porto Alegre, v.3, n.2, p: 114-124, jun/dez 2016.

TORTORA, G. J., CASE, C. L., FUNKE, B.R. Microbiologia. 12.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016. 964p.

UNIVERSITY OF ALBERTA. Purification of PCR products for Sequencing. Disponível em: <[http://www.biology.ualberta.ca/facilities/MBSU/uploads/sop\\_pdf/Purification\\_of\\_PCR\\_Products\\_for\\_Sequencing.pdf](http://www.biology.ualberta.ca/facilities/MBSU/uploads/sop_pdf/Purification_of_PCR_Products_for_Sequencing.pdf)> Acesso em: 23 ago. 2017

VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., VOS, P. de, KERSTERS, K., SWINGS, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev 60:407-438.

VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. Studies In Mycology, [s.l.], v. 61, p.137-144, 2008. Elsevier BV.

---

XU, Jianping; ADAMOWICZ, Sarah. Fungal DNA barcoding1. Genome, [s.l.], v. 59, n. 11, p.913-932, nov. 2016. Canadian Science Publishing.

**Recebido:** 31 ago. 2017.

**Aprovado:** 02 out. 2017.

**Como citar:**

SANTOS, M. C. et al. Taxonomia de microrganismos por sequenciamento . In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

**Correspondência:**

Mariely Cristine dos Santos

Rua Padre Nóbrega, número 1823, Vila Estrela, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

**Direito autoral:**

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

