

Isolamento e extração de DNA de microrganismos de solo da região oeste do estado do Paraná

Isolation and DNA extraction of soil microorganisms from the western of Paraná State

RESUMO

Taynara Cassia Seratti
tayserattiel@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Thiago Cintra Maniglia
thiagomaniglia@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Os microrganismos possuem características de interesse que podem ser utilizadas para ajudar e/ou solucionar problemas. Dessa forma, o trabalho consiste no isolamento de espécies de microrganismos, mais especificamente de *Bacillus*, seguido da extração de DNA genômico a partir de amostras de solos da região da cidade de Toledo-PR, visando posterior aplicação biotecnológica. As amostras foram coletadas em seis locais diferentes, diluídas e aquecidas a 80°C. Em seguida, as diluições foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB) e incubadas a 30°C por aproximadamente 24 horas. Após o crescimento, as colônias fenotipicamente diferentes foram inoculadas a fim de se obter linhagens puras e visualizadas em microscópio óptico, após metodologia de coloração de Gram. O DNA foi extraído baseado no método da fervura, seguido de eletroforese com gel de agarose. Obteve-se 34 colônias isoladas, porém o DNA destas não pôde ser visualizado no gel, realizou-se então a amplificação do 16S para confirmação da eficiência na extração do DNA. A metodologia de coloração foi realizada com apenas onze isolados, em que seis foram Gram positivos e cinco Gram negativos. Todas amostras apresentaram células com formato de bastonetes. Portanto, através do isolamento, foi possível ter uma pequena noção da variedade de espécies encontradas em solos.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus* sp. Biotecnologia. Aplicações.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Microorganisms has several characteristics of interest that can be used to help or even solve problems that surround us. Thus, this work consists in the isolation of microorganisms species, specifically *Bacillus* species, followed by the extraction of genomic DNA from microorganisms from soil samples near of the Toledo-PR city, to further biotechnological application. The samples were collected in six different sites, diluted and heated at 80°C, Then, the dilutions were plated in Luria Bertani (LB) medium, and incubated at 30°C for approximately 24 hours. After growth, the phenotypically different colonies were inoculated by exhaustion in order to obtain pure strains and visualized under optical microscope, after Gram staining methodology. The DNA was extracted based on the boil method, followed by agarose gel electrophoresis 34 isolated colonies were obtained, however their DNA could not be visualized in the agarose gel, so the 16S was amplified to confirm the extraction efficiency. The Gram staining was performed with only eleven isolates, where six were Gram positive and five Gram negative. All samples presented rods cells shaped. Therefore, through isolation, it was possible to have a small idea of the variability of soil species.

KEYWORDS: *Bacillus* sp. Biotechnology. Applications.

INTRODUÇÃO

O Brasil tem aumentado significativamente sua produção agropecuária nos últimos anos, se tornando um grande exportador e participante ativo no comércio mundial de agronegócio, possuindo liderança mundial consolidada (SCOLARI, 2006). Por outro lado, ao mesmo tempo que o país comemora a liderança no setor de agronegócio, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o Brasil é responsável por 1/5 do consumo mundial de agrotóxicos, para uso, principalmente, no controle de pragas, doenças e ervas daninhas (EMBRAPA, 2016).

O uso intenso de agrotóxicos no Brasil, segundo a Embrapa (2016), vem causando diversos problemas como a contaminação do solo, alimentos, água e animais, além da intoxicação de agricultores, desequilíbrio biológico e resistência de pragas aos princípios ativos. Diante disso, tem aumentado a busca por alternativas que atendam às necessidades ambientais e dos consumidores, mas que sejam de preferência, soluções sustentáveis.

Algumas espécies de bactérias, de acordo com Kaki (2013), já têm sido estudadas para essa finalidade, é o caso das bactérias do gênero *Bacillus*, o qual é capaz de produzir fungicidas biológicos, inseticidas e nematocidas. As espécies de *Bacillus* apresentam vantagens sobre outros gêneros devido a sua capacidade de produzir esporos em condições ambientais desfavoráveis e de resistir às altas temperaturas.

Além disso, os *Bacillus*, apresentam um grande potencial relacionado ao crescimento de plantas, uma vez que são capazes de inibir patógenos próximos às raízes das plantas, solubilizar fosfatos minerais ou outros nutrientes presentes no solo, produzem ou alteram a concentração de hormônios vegetais, como ácido indol acético, ácido giberélico e citocininas, além de fixar na maioria das vezes nitrogênio, o que contribui significativamente para a planta (ZHANG, 2016; CATTELAN, 1999).

Portanto, o objetivo do presente trabalho consiste no isolamento de espécies de microrganismos, mais especificamente de *Bacillus* sp. a partir de amostras de solos da região da cidade de Toledo-PR, visando posterior aplicação biotecnológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Seis amostras de solos foram coletadas em áreas de plantio de grãos, hortaliças e mata preservada na cidade de Toledo-PR. As amostras foram coletadas com espátula e armazenadas em frascos de vidro devidamente esterilizados. O material foi coletado a uma profundidade de 5-10 cm, próximo às raízes de plantas e posteriormente, encaminhadas ao laboratório de biologia molecular da UTFPR campus Toledo e mantidas em ambiente refrigerado.

Pesou-se 10 g do solo e dissolveu em 100 mL de água estéril. Em seguida, realizou-se mais duas diluições, seguidas de homogeneização e aquecimento a 80°C por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB) e incubadas por 24 horas a 30°C. A metodologia adotada favorece o isolamento de *Bacillus*, uma vez que o aquecimento faz com que reste apenas as bactérias termotolerantes.

Cada colônia com morfologia diferente foi inoculada por esgotamento em uma nova placa afim de se obter linhagens isoladas. Em seguida, uma única colônia isolada foi inoculada em triplicata em microtubos contendo 1,0 mL de meio LB por 48 horas, a 30°C. Um microtubo foi armazenado em glicerol e destinado ao banco de cepas em freezer -80°C e os outros dois utilizados para análises microscópicas e extração de DNA.

Para as análises microscópicas foi realizada a coloração Gram. As lâminas com a amostra foram cobertas com solução cristal violeta durante um minuto e, lavadas com água destilada. Em seguida, adicionou-se solução de lugol por um minuto e lavou-as novamente. Gotejou-se álcool-acetona e lavou-se as lâminas com água corrente. Por fim, adicionou-se fucsina de gram e aguardou-se 30 segundos para então lavar com água destilada e secar. As amostras foram analisadas em microscópio óptico para observação do formato das bactérias (bastonetes ou cocos) e da presença de células vegetativas e esporos.

Para a extração de DNA genômico, utilizou-se o método baseado em fervura após cada amostra estar no mínimo 48 horas em meio líquido. O método consiste na centrifugação das amostras à 13000 rpm por 5 minutos, seguido do descarte do meio. Colocou-se, posteriormente 100 µL de água estéril, passou-as no vórtex e as levou ao banho maria a 100°C por 15 minutos, passou-as no vórtex novamente antes do banho de gelo de 10 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos em 14000 rpm e armazenadas em freezer.

Após a extração do DNA, realizou-se eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado a partir de 10 mL de TBE 10× seguido da adição de 90 mL de água destilada e 1 g de agarose. Em seguida, aqueceu o preparo no micro-ondas por aproximadamente 2 minutos e com a solução morna adicionou-se 10 µL de SYBR Safe DNA 10.000x. Posteriormente, 5 µL de DNA juntamente com 1,5 µL de *Loading Buffer* foi aplicado no gel de agarose que já se encontrava na cuba coberto com tampão de corrida. Aplicou-se também nos primeiros poços de cada pente, 5 µL de *Ladder*, a fim de quantificar as amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O local e coordenadas das seis amostras coletadas nas redondezas da cidade de Toledo, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Local e coordenadas das amostras coletadas

Amostras	Local	Coordenadas
1	Solo de mata fechada	-24.7010165, -53.7304351
2	Solo de milharal	-24.7012115, -53.7304582
3	Solo milharal	-24.7019498, -53.7691095
4	Solo próximo à Pitangueira	-24.6977247, -53.7697633
5	Solo raiz amora selvagem	-24.6976811, -53.7681798
6	Solo horta couve manteiga	-24.7112585, -53.7345342

Fonte: Autoria própria (2019).

Dentre as colônias formadas após plaqueamento, escolheu-se as fenotipicamente diferentes, obtendo-se dessa forma, 34 isolados. Na Figura 1 é possível visualizar algumas das linhagens puras obtidas.

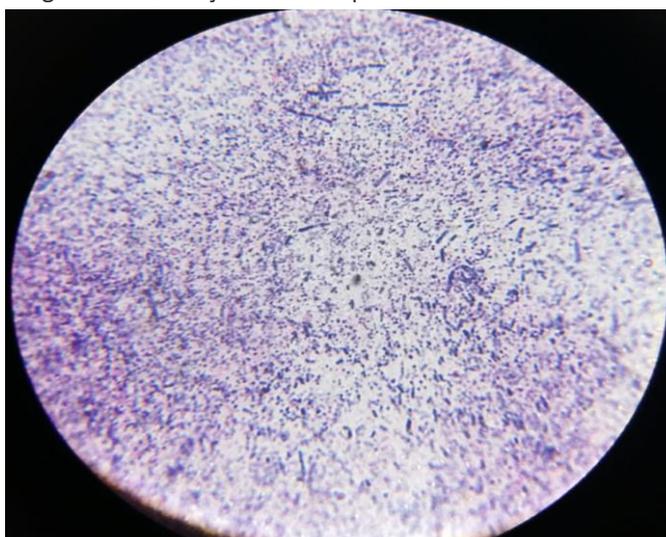
Figura 1 – Linhagens puras obtidas após escolha das colônias morfologicamente diferentes



Fonte: A autoria própria (2019).

Posteriormente, realizou-se o procedimento de coloração de Gram a fim de confirmar o gênero das bactérias. A metodologia de coloração foi realizada com apenas 11 isolados. Uma das lâminas preparadas esta apresentada na Figura 2.

Figura 2 – Coloração de Gram para os isolados em meio LB



Fonte: A autoria própria (2019).

De acordo com Romano (2015), se após a coloração de Gram, o isolado apresentar forma de bastonete e coloração roxa, ou seja, este conservar a cor

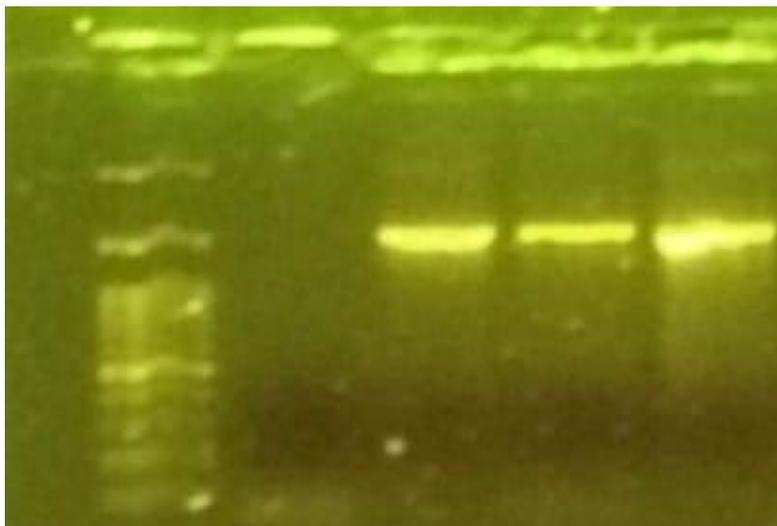
violeta, trata-se de um Bacilo Gram positivo. E se, o isolado apresentar forma de bastonete, mas possuir coloração rosa, pode-se considerar um Bacilo Gram negativo. Dessa forma, dentre os 11 isolados, 6 são Gram positivos e 5 Gram negativos. Todos os isolados apresentaram células com formato de bastonetes e colônias com aspecto característico do gênero *Bacillus*.

A extração de DNA foi realizada com os 34 isolados pelo método da fervura. Esta metodologia foi escolhida por se tratar de um método mais simples, rápido, de menor custo e sem necessidade de reagentes, eliminando testes desnecessários caso o resultado seja eficiente. Por outro lado, extrai uma menor quantidade de DNA quando comparado à utilização de kits de extração.

A eletroforese em gel de agarose foi realizada a fim de confirmar a eficiência da extração de DNA. Das 34, escolheu-se 22 amostras para esse procedimento. Porém, como a extração pelo método da fervura gera uma quantidade pequena de DNA, não foi possível a visualização de bandas no gel.

Outra alternativa adotada foi a realização de um teste com o DNA de 3 amostras a partir da amplificação do DNA (PCR) da região 16S. O gel da eletroforese após a amplificação pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3 – Gel de agarose após amplificação do DNA na região 16S



Fonte: Autoria própria (2019).

Portanto, a partir da Figura 3, pode-se concluir que a extração de DNA pela utilização do método da fervura foi eficiente, uma vez que, apesar de não aparecer DNA no gel de quantificação, o resultado do gel após a PCR indicou que há quantidade de DNA suficiente para amplificação e posterior sequenciamento, com qualidade de genes para identificação molecular dessas amostras.

CONCLUSÃO

Através do isolamento destes microrganismos, foi possível ter uma pequena noção da variedade de espécies encontradas em solos, uma vez que estas são apenas as termotolerantes e a quantidade de microrganismos cultiváveis ainda é muito baixa.

A bioprospecção de microrganismos do solo vem se tornando cada vez mais importante, pois existe uma variedade de espécies ainda não descobertas que podem ter características relevantes, podendo ser aplicadas em diversos processos biotecnológicos de interesse sustentável. Além de que, o gênero *Bacillus* possui grande potencial biotecnológico, podendo ser utilizados para contribuir ou até solucionar problemas da região oeste do Paraná.

REFERÊNCIAS

EMBRAPA. **Controle Biológico**. 2016. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16154268/control-biologico-ciencia-a-servico-da-sustentabilidade>. Acesso em: 30 mai. 2019.

CATTELAN, Alexandre José. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999.

KAKI, Asma. **Biocontrol and Plant Growth Promotion Characterization of *Bacillus* Species Isolated from *Calendula officinalis* Rhizosphere**. Published in *Indian J Microbiol*. 2013.

SCOLARI, D. **Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil**. Embrapa Informação Tecnológica. 2006. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/417182/1/Producaoagricolamundial.pdf>. Acesso em: 30 mai. 2019.

ZHANG, Mengjun. **Isolation and Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* IBFCBF-1 with Potential for Biological Control of Phytophthora Blight and Growth Promotion of Pepper**. *Journal of Phytopathology*. 2016.

ROMANO, M. Laminário de Microbiologia. **Microbiologia e Imunologia**. 2015. Disponível em: <https://www.fop.unicamp.br/index.php/pt-br/laminarios-microbiologia/categoria/microbiologia-e-imunologia>. Acesso em: 02 jun. 2019.