
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS
PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE SOLO SOB
CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

MÁRCIA MARIA ROSA

Dezembro - 2006

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS
PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE SOLO SOB
CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

MÁRCIA MARIA ROSA

Orientadora: DR^a SÂMIA MARIA TAU-K-TORNISIELO (CEA – UNESP/Rio Claro-SP)

Co-orientadora: DR^a SANDRA REGINA CECCATO-ANTONINI (CCA – UFSCar/ Araras-SP)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Dezembro - 2006

“A natureza em seus caprichos e mistérios condensa em pequenas coisas o poder de dirigir as grandes, nas sutis a potência de dominar as mais grosseiras, nas coisas simples a capacidade de eleger as complexas. Assim, a explosão de uma coisa ínfima como o átomo, chega a arrasar cidades enormes e esterilizar regiões inteiras. E um miligrama de hormônio em demasia ou carência chega a modificar as funções do corpo todo, enfermando o organismo. E a simples destruição dos grumos da superfície do solo chega a destruir povos e países, trazendo a fome, a miséria e a doença e, como consequência, a escravidão”.

Artur Primavesi

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por me dar saúde, serenidade e competência para superar obstáculos e alcançar meus objetivos.

À minha família, em especial meus pais, Maria Isabel e Mauro, e meus irmãos, Mauro Junior, Milena e Murilo, pelo apoio e amor sempre presentes. A Maria Ivone e Alcides, por gerarem o ser mais precioso de minha vida.

À minha querida orientadora Dr^a Sâmia Maria Tauk Tornisielo pela amizade e confiança, e pelos conselhos sempre imprescindíveis em todos os momentos.

À minha co-orientadora e mais que isso, amiga Dr^a Sandra Regina Ceccato Antonini, pelo suporte, carinho e acolhimento em todas as fases, boas e ruins.

À minha primeira e eterna orientadora Prof^a Silvana Perissatto Meneghin, sempre presente com palavras acolhedoras, carinho e amizade.

À Lucinha, técnica do LAMAM, pela amizade, e aos amigos de laboratório: Vivi, Helô, Kanela, Kontente, Fuska, Trimilik, Babi, Christiann, Guilherme, Manu, Vanda, Ana Paula, Fabrícia, Mônica, Rita, presentes no dia-a-dia do trabalho...obrigada pela ajuda, carinho e amizade. Aos companheiros da pós-graduação em Microbiologia Aplicada, Bruna Baldissera, Adriana Campos, Alex Almeida...juntos na mesma caminhada. Aos funcionários do CEA – UNESP... à Sara, pela ajuda em todas as horas necessárias, e à Eleni, pelo suporte no laboratório.

Aos meus amigos: Mirela (mamãe da Alice), Otávio (papai da Alice), Sílvia (futura mamãe da Beatriz), Murilo (futuro papai da Beatriz), Dr. Jackson Junior (meu ídolo), Cátia (direto de Bordeaux - França), Jackson (Pai), Érica e Giraia, Márcio (Fofochuco), Valquíria e Renata (cunhadas), Dani Scarabel, Henrique (Cintura), Fernando (Prê) e minha querida Ima (my teacher / ma professeur), sempre presentes.

À Dr^a Siu Mui Tsai pela ajuda no trabalho, e ao Sr. Elias pelo acolhimento no laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA – USP), obrigada pela atenção e ajuda.

E a todos que, de uma forma ou outra, ajudaram na concretização deste sonho, meus agradecimentos.

A minha cara metade...

André Vinícius Magri

dedico.

Obrigada por você existir.

Obrigada pelo seu amor.

Te amo!!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Microbiologia do solo.....	4
3.2. Isolamento dos microrganismos do solo.....	7
3.3. Técnicas moleculares para análise da diversidade microbiana do solo	8
3.4. Extração de DNA microbiano do solo.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Amostragem do solo.....	21
4.2. Análises das amostras de solo.....	22
4.2.1. <i>Análise química e física do solo</i>	22
4.2.2. <i>Teor de umidade do solo</i>	23
4.2.3. <i>Análise da biomassa microbiana do solo</i>	23
4.3. Técnicas de extração de DNA do solo.....	23
4.3.1. <i>Técnica SMA</i>	24
4.3.2. <i>Técnica VIE</i>	25
4.3.3. <i>Técnica SAA</i>	25
4.3.4. <i>Técnica CUL</i>	26
4.3.5. <i>Técnica SEL</i>	27
4.3.6. <i>Técnica TSA</i>	27
4.3.7. <i>Técnica DIR</i>	28
4.3.8. <i>Técnica WEC</i>	28
4.3.9. <i>Técnica PRO</i>	29
4.3.10. <i>Extração de DNA do solo através do uso de kit comercial</i>	30
4.4. Purificação da solução de DNA.....	40
4.5. Análise das soluções de DNA.....	40
4.5.1. <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	40
4.5.2. <i>Espectrofotometria</i>	40
4.5.3. <i>Coloração da solução de DNA</i>	41

4.5.4. PCR.....	41
4.6. Extração de DNA de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Análises das características dos solos testados.....	44
5.2. Comparação da eficiência das técnicas de extração de DNA dos solos testados	46
5.3. Coloração das soluções de DNA	53
5.4. PCR.....	58
5.5. Comparação geral das técnicas testadas.....	61
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da parceria Usina Univalem e empresa Ajinomoto para produção do adubo orgânico obtido através da compostagem de esterco e resíduos das indústrias, e aplicado nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar orgânico (PLANETA ORGÂNICO, 2005)..	25
Figura 2. Fluxograma geral da técnica SMA.....	31
Figura 3. Fluxograma geral da técnica VIE.....	32
Figura 4. Fluxograma geral da técnica SAA.	33
Figura 5. Fluxograma geral da técnica CUL.	34
Figura 6. Fluxograma geral da técnica SEL.	35
Figura 7. Fluxograma geral da técnica TSA.....	36
Figura 8. Fluxograma geral da técnica DIR.....	37
Figura 9. Fluxograma geral da técnica WEC.....	38
Figura 10. Fluxograma geral da técnica PRO.....	39
Figura 11. Medidas de absorvância para quantificação de substâncias húmicas (HE, 2004).	49
Figura 12. Gel de eletroforese (agarose 0,8%) realizado com DNA bruto extraído dos solos sob manejo orgânico (O) e convencional (C) testados, utilizando-se diferentes técnicas de extração de DNA, cujas siglas estão descritas em Materiais e Métodos. M refere-se ao marcador de peso molecular de 1 kb.	50
Figura 13. Gel de eletroforese (agarose 0,8%) realizado com DNA purificado extraído dos solos sob manejo orgânico (O) e convencional (C) testados, utilizando-se diferentes técnicas de extração de DNA, cujas siglas estão descritas em Materiais e Métodos. M refere-se ao marcador de peso molecular de 1 kb.....	50
Figura 14. Gel de eletroforese (agarose 0,8%) realizado com DNA extraído dos solos sob manejo orgânico (O) e convencional (C) testados, utilizando-se a técnica de Selbach para extração de DNA. M refere-se ao marcador de peso molecular de 1 kb	51
Figura 15. Fotografia do spin column, utilizado para a purificação da solução de DNA genômico.....	54

- Figura 16.** Microtubos com solução de DNA extraído do solo (o – solo orgânico, c – solo convencional).....55
- Figura 17.** Microtubos com solução de DNA extraído do solo (o – solo orgânico, c – solo convencional).....56
- Figura 18.** Microtubos com solução de DNA extraído do solo (o – solo orgânico, c – solo convencional).....57
- Figura 19.** Microtubos com solução de DNA extraído do solo através de kit de extração comercial (KIT) (o – solo orgânico, c – solo convencional).58
- Figura 20.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados de PCR da região 16S rDNA (*primers* BA338Fgc e UN518r) a partir de amostras de DNA sem purificação. Legenda: - controle negativo, + controle positivo com *Pseudomonas fluorescens*; PRO O/ PRO C - técnica Proposto em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; SEL O/ SEL C – técnica de Selbach em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; DIR O/ DIR C – técnica de Direito em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; KIT O/ KIT C – kit comercial em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; M: marcador de peso molecular 100 bp.59
- Figura 21.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados de PCR da região 16S rDNA (*primers* BA338Fgc e UN518r) a partir de amostras de DNA purificadas. Legenda: - controle negativo, + controle positivo com *Pseudomonas fluorescens*; PRO O/ PRO C - técnica Proposta em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; SEL O/ SEL C – técnica de Selbach em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; DIR O/ DIR C – técnica de Direito em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; M: marcador de peso molecular 100 bp.59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do DNA extraído do solo por PCR.....	41
Tabela 2. Características químicas dos solos testados.	44
Tabela 3. Umidade e granulometria dos solos testados.	45
Tabela 4. Matéria orgânica, carbono orgânico e biomassa microbiana dos solos testados.	45
Tabela 5. Medidas de pureza (relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}), das amostras de DNA sem purificação extraídos de solo orgânico (O) e convencional (C), utilizando-se diferentes técnicas de extração de DNA.....	47
Tabela 6. Medidas de pureza (relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}), das amostras de DNA sem purificação extraídos de solo orgânico (O) e convencional (C), utilizando-se diferentes técnicas de extração de DNA.....	47
Tabela 7. Quantificação do DNA por espectrofotometria, extraída de solo sob manejo orgânico (O) e convencional (C).	48
Tabela 8. Comparação entre os principais técnicas de extração de DNA de solo testadas.	61

ABREVIATURAS

- **ARDRA** - Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado
- **bp** – pares de base
- **CTAB** – cetil-trimetil brometo de amônio
- **CTC** – capacidade de troca catiônica (análise química do solo)
- **DGGE** – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
- **DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- **dNTP** – desoxinucleotídeos
- **EDTA** – Ácido Etilenodiaminobenzóico
- **Kb** – 1000 pares de bases
- **PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- **PEG** – Polietilenoglicol
- **pH** – potencial hidrogeniônico
- **PVPP** – polivinilpolipirrolidona
- **rDNA** – DNA ribossomal
- **SB** – soma de bases (K + Ca + Mg) (análise química do solo)
- **SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio
- **SSPC** - Conformação de Polimorfismo em Fita Simples
- **TGGE** – Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura
- **T-RFLP** - Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminal
- **V%** - saturação por bases, porcentagem de bases que ocupam a CTC do solo (análise química do solo).

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE SOLO SOB CULTIVO DE CANA DE AÇÚCAR

Autora: MÁRCIA MARIA ROSA

Orientadora: Dr^a SÂMIA MARIA TAUKE-TORNISIELO

Co-orientadora: Dr^a SANDRA REGINA CECCATO-ANTONINI

RESUMO

O solo é um ecossistema caracterizado pela grande complexidade de difícil estudo, devido à sua heterogeneidade, especialmente os microrganismos do solo. Atualmente, ferramentas da biologia molecular têm sido usadas para mostrar o potencial biotecnológico do solo, através dos genes microbianos. A extração direta do DNA é uma etapa importante nesse tipo de estudo, porém, continua sendo um obstáculo para a avaliação da diversidade microbiana do solo. Esses estudos no Brasil apresentam algumas dificuldades, uma vez que a maioria das técnicas foi desenvolvida para solos de clima temperado. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar dez diferentes técnicas para extração direta de DNA de solos em áreas de cultura de cana-de-açúcar sob manejo orgânico e convencional. A eletroforese se apresentou como a técnica mais adequada para se conhecer a eficiência da extração do DNA, através da intensidade e tamanho de suas bandas. A técnica de Selbach (SEL) apresentou melhores resultados, com bandas de DNA mais intensas e sem arraste, indicando a obtenção de uma solução com menores teores de contaminantes. Com a técnica de Direito (DIR) também se verificou bandas de DNA, porém menos fortes e sem arraste. A técnica proposta neste estudo (PRO) resultou em bandas de DNA fortes, porém com arraste, indicando a necessidade de uma etapa para purificação do DNA extraído. Esta mostrou ser a metodologia de mais fácil e rápida execução, sendo que, após processo de purificação a região 16S do DNA ribossomal, utilizando-se *primers* universais, foi amplificada satisfatoriamente a partir do DNA obtido do solo. Bandas de DNA apresentadas na eletroforese a partir das amostras de solo sob

manejo orgânico foram mais intensas do que aquelas de manejo convencional. Estes resultados estão relacionados com a maior quantidade de biomassa microbiana presente no solo orgânico. Este estudo é uma contribuição para a seleção e aperfeiçoamento de ferramentas moleculares visando a avaliação da diversidade microbiana aplicada aos solos brasileiros.

Palavras-chave: microbiologia do solo, extração de DNA, PCR, cana-de-açúcar

EVALUATION OF DIFFERENT METHODOLOGIES FOR SOIL DNA EXTRACTION IN SUGAR CANE CROP AREAS

Author: MÁRCIA MARIA ROSA

Adviser: Dr^a SÂMIA MARIA TAUKE-TORNISIELO

Co-Adviser: Dr^a SANDRA REGINA CECCATO-ANTONINI

ABSTRACT

Soil is an ecosystem characterized by a great complexity and hard to study due to its heterogeneity, especially the soil microorganisms. Nowadays, molecular biology tools have been used to show the biotechnological potential of the soil mainly through microbial genes. Direct extraction of DNA from soil is an important step in this kind of study, however it is still an obstacle for microbial diversity evaluation. Besides, the majority of techniques proposed was developed for soils from temperate climate. This work aimed to evaluate ten different techniques for soil direct DNA extraction from sugar cane crop areas under organic and conventional managements, which presented distinct results. Gel electrophoresis was the most appropriate technique to evaluate the efficiency of DNA extraction, through the intensity and size of the bands. The Selbach technique (SEL) showed the best results, with more intense DNA bands and without smearing, indicating that a DNA solution with low concentration of contaminants was obtained. With the Direito technique (DIR) DNA bands were also verified, but less intensive and also without smearing. The technique proposed in this study (PRO) resulted in intense DNA however with smearing, indicating that a DNA purification step is necessary. This technique was easy, cheap and rapid to execute, enabling the amplification of 16S rDNA (using universal primers) after DNA solution purification. The intensity of DNA bands, as revealed by electrophoresis, was higher when using DNA solution extracted from soil under organic management, which also presented higher microbial biomass. This study is a contribution for the selection and improvement of molecular tools to the study of microbial diversity applied to Brazilian soils.

Key-words: soil microbiology, DNA extraction from soil, PCR, sugar cane

1. INTRODUÇÃO

A microbiota do solo é extremamente importante para a manutenção da vida no planeta. Esses organismos participam da ciclagem de nutrientes através da decomposição de matéria orgânica, auxiliam na manutenção da estrutura física e química do solo, mantendo-o, de certa forma, fértil, além de possuírem elevado potencial de uso na indústria biotecnológica (KENNEDY e PAPENDICK, 1995).

O solo é considerado o ecossistema mais complexo e heterogêneo da Terra, capaz de abrigar uma diversidade biológica imensa sendo, portanto, um ambiente desafiante e tendo ainda uma comunidade microbiana não totalmente conhecida.

O tamanho e diversidade microbiológica do solo são desconhecidos. Estima-se, porém, que 99% das espécies de bactérias presentes no mesmo são incultiváveis, isto é, não podem ser extraídas, isoladas e cultivadas com técnicas já comumente usadas nos laboratórios (TORSVIK e OVREAS, 2002).

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos, os métodos e técnicas para isolamento de microrganismos não possibilitam que todas as espécies presentes no solo sejam isoladas e, portanto, conhecidas, uma vez que estas selecionam os microrganismos isolados através da simplicidade dos meios de cultura. O solo pode ser definido como uma caixa preta, um lugar ainda desconhecido e que necessita de muito estudo e pesquisa, pois

só dessa forma será possível conservar as espécies nele presentes e utilizá-las de forma benéfica na agricultura sustentável e na indústria biotecnológica.

Neste contexto, a biologia molecular tem se apresentado como uma ferramenta útil na análise microbiana do solo. A extração do DNA microbiano diretamente do solo é a etapa mais crítica de todo o processo de avaliação, apresentando grandes limitações, principalmente a co-extração de outros compostos contaminantes, como os ácidos húmicos, que prejudicam análises do material nucléico extraído (TEBBE e VAHJEN, 1993).

Além da co-extração de contaminantes, variações podem ocorrer nas técnicas aplicadas em diferentes tipos de solo (OGRAM, 2000). O principal problema observado se refere às técnicas de extração, que na sua quase totalidade, foram desenvolvidas para solos de área de clima temperado e, de forma geral, não funcionam para a extração do DNA em solos de área de clima tropical e subtropical (VIESTEL, 1995; SANTOS, 2002).

2. OBJETIVOS

Devido à necessidade de metodologias para a quantificação e avaliação da microbiota de solos brasileiros, e visando o aperfeiçoamento de ferramentas moleculares para estes fins, os objetivos deste estudo foram:

- avaliar dez diferentes técnicas de extração direta de DNA de solo de cultura de cana-de-açúcar sob manejos convencional e orgânico, visando alto rendimento e pureza;
- otimizar a metodologia de extração de DNA quanto ao tempo, facilidade de execução e custo menor;
- comparar diferentes métodos de análise de pureza e quantificação de DNA extraído de solo;
- verificar a qualidade do DNA obtido em reação de polimerase em cadeia (PCR) da região 16S do DNA ribossomal.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Microbiologia do solo

O ecossistema do solo é caracterizado por uma alta complexidade constituída por sua estrutura predominantemente sólida e heterogênea, com diferentes características físicas, químicas e biológicas (NANNIPERI et al., 1989), no qual interagem inúmeros processos, que estão constantemente em fluxo e são de natureza descontínua e de difícil medição.

Os microrganismos do solo participam de forma direta do ciclo dos nutrientes e na decomposição da matéria orgânica derivada de plantas e animais mortos, além de atuarem na melhoria das características químicas e físicas do solo, e auxiliarem o desenvolvimento das plantas através de simbioses de extrema importância na agricultura (KENNEDY e PAPENDICK, 1995).

O solo tem grande capacidade de responder de forma quase imediata às alterações do ambiente causada por mudanças no seu manejo, e assim, a atividade microbiana do solo reflete a influência conjunta de todos os fatores que regulam a degradação da matéria orgânica e a transformação dos nutrientes (KENNEDY e PAPENDICK, 1995; STENBERG, 1999).

Os microrganismos constituem ainda fonte e depósito de nutrientes em todos os ecossistemas e participam ativamente em processos benéficos como na degradação de

compostos persistentes aplicados ao solo, em associações micorrízicas (KENNEDY e PAPENDICK, 1995; KENNEDY e SMITH, 1995), na fixação biológica de nitrogênio, solubilização de nutrientes para as plantas (GEORGE et al., 1995; TIMONEN et al., 1996), na redução de patógenos e pragas de plantas (SRIVASTAVA et al., 1996; FILION et al., 1999; SMITH e GOODMAN, 1999), na estruturação do solo (WRIGHT e UPADHYAYA, 1998; DODD et al., 2000), na sua fertilidade (YAO et al., 2000; O'DONNELL et al., 2001) e em outras propriedades edáficas que afetam o crescimento vegetal.

Apesar de haver preocupação geral da sociedade com relação ao tema biodiversidade, o foco das atenções tem se voltado predominantemente para os recursos animais e vegetais, e pouca preocupação tem sido dispensada à porção menos evidente, porém não menos importante da biodiversidade, os microrganismos (WILSON, 1988; KENNEDY e SMITH, 1995).

Nos últimos anos houve aumento no interesse da microbiologia devido à sua relação com a manutenção da sustentabilidade do ambiente, já que os microrganismos são importantes em diversos processos e, conseqüentemente, na manutenção do equilíbrio ambiental. Atividades antrópicas podem afetar o funcionamento e diminuir a biodiversidade dos ecossistemas, resultando em desequilíbrios ecológicos de conseqüências imprevisíveis, e na extinção de espécies essenciais à manutenção do ecossistema (MELLO e AZEVEDO, 1998).

A intensidade da atividade da biomassa microbiana do solo está diretamente relacionada à quantidade e qualidade do carbono e outros nutrientes disponíveis através de resíduos de plantas, insumos orgânicos e exsudatos da raiz (MARTYNIUK e WAGNER, 1978; ADAMS e LAUGHLIN, 1981; POWLSON et al., 1987; FRASER et al., 1988). Outros fatores que influenciam a comunidade microbiana são a umidade do solo e a sua temperatura (CAMPBELL e BIEDERBEEK, 1976), constituição física do solo (DORAN, 1987) e interações com a fauna edáfica (BEARE et al., 1992).

O entendimento dos processos microbianos é importante para o manejo de sistemas de produção, particularmente àqueles relacionados à adição de matéria orgânica que será fonte de nutrientes para a solução do solo (SMITH e PAUL, 1990). A diminuição

da diversidade microbiana no solo pode resultar em problemas na ciclagem de nutrientes e crescimento das plantas (REBER, 1992).

Estudos mostram que as comunidades microbianas do solo podem ser fortemente influenciadas por práticas agrícolas, como pesticidas, adubos solúveis, calagens e herbicidas, os quais modificam o ambiente do solo causando um decréscimo no nível da biomassa e diversidade, e alteração na estrutura das comunidades microbianas (BAATH, 1989; SMIT et al., 1997; ENGELEM et al., 1998; JONSEN et al., 2001).

Gunapala e Scow (1998) encontraram altos valores de atividade microbiana em solos sob manejo orgânico, quando comparados com aqueles tratados sob manejo convencional. A introdução de insumos orgânicos nos solos tem sido associada às propriedades desejáveis no solo, como alta capacidade de retenção de água, menor compactação e agregação física das partículas (boa estrutura), estabilização do pH, formando assim um ambiente extremamente propício para o desenvolvimento de microrganismos, devido principalmente ao alto teor de matéria orgânica.

Apesar dos sistemas de produção orgânica terem crescido muito nos últimos anos, pouco ainda se conhece sobre as comunidades microbianas do solo sob este manejo, ou o impacto destas práticas de produção no campo. Tem sido demonstrado que os solos submetidos ao manejo orgânico, isto é, sem o uso de fertilizantes e defensivos químicos e com adição de matéria orgânica, contém significativamente maiores valores de biomassa microbiana, se comparados àqueles com manejo convencional (LUNDQUIST et al., 1999).

As comunidades microbianas que ocorrem nos solos são constituídas por várias espécies que ocupam os diferentes nichos disponíveis. Essas comunidades são geralmente constituídas por poucas espécies contendo muitos indivíduos e por muitas espécies com poucos indivíduos. Embora as populações dominantes sejam as maiores responsáveis pelos fluxos de matéria e energia na comunidade, as espécies menos abundantes são as que mais contribuem para a diversidade biológica (ATLAS e BARTHA, 1997).

Uma elevada diversidade de espécies contribui para o uso mais eficiente dos recursos nutricionais disponíveis. Interações interpopulacionais equilibradas também contribuem para maior eficiência no uso desses recursos, especialmente quando envolve reações sintróficas, ou seja, quando uma população contribui para suprir a demanda

nutricional de outra e vice-versa. Desse modo, comunidades microbianas caracterizadas por alta diversidade necessitam de pouca energia para sustentar a biomassa ali presente, o que se reflete na baixa produtividade primária por unidade de biomassa (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Alta diversidade está geralmente associada à elevada estabilidade da comunidade, onde cada população desempenha papel funcional que determina a manutenção normal dos fluxos de matéria e de energia em cada nível trófico de um ecossistema particular.

Sob uma perspectiva funcional, o solo é, inquestionavelmente, responsável pela sustentabilidade das outras formas de diversidade terrestre, “prestando serviços” a todos os ecossistemas, os quais incluem produção de alimentos e fibras, suplemento de água doce potável e remediação de poluentes. Essa funcionalidade do solo emerge de sua diversidade biológica (CRAWFORD et al., 2004).

3.2. Isolamento dos microrganismos do solo

O solo sustenta uma imensa diversidade de micróbios, a qual, na sua grande maioria, continua inexplorada. Método direto da determinação da microbiota do solo, como exame de lâminas em microscopia óptica tem demonstrado que a imensa maioria das populações microbianas aí presentes não tem sido isolada (FAEGRI et al., 1977; HOLBEN et al., 1988).

O termo “anomalia da contagem em placa” foi apresentado por Staley e Konopka (1985) para descrever os problemas do uso de placas de Petri e meio de cultura no estudo da diversidade microbiana do solo. Os resultados encontrados por esses autores demonstraram que a quantidade de microrganismos no solo é subestimada quando se utiliza a contagem em placa. Nesta técnica há perda de células por sedimentação, devido a sua ligação às partículas de solo durante as diluições e plaqueamentos. Morte das células pode ocorrer durante as diluições ou no dessecamento da superfície das placas.

Não existe um único meio de cultura capaz de imitar as condições de crescimento que os microrganismos encontram na natureza (ROSZAK et al., 1985), principalmente um ambiente tão complexo como o solo. Há baixa taxa de crescimento de muitas espécies

microbianas como os actinomicetos, pelo fato de estarem em condição viável, mas não cultivável, devido ao pH, mudança de temperatura, danos causados pela luz ou resposta ao estresse nutricional (OLIVER et al., 1994 apud WELLINGTON et al., 1997).

Bakken (1997) encontrou uma relação direta do tamanho da célula com a capacidade de cultivo. Apenas 2 a 5 % das células de diâmetro abaixo de 0,4µm cresceram em meio de cultura, ao passo que a possibilidade de cultivo de células com diâmetro entre 0,6 e 0,8 µm e acima de 0,8 µm foi de 9 e 38 %, respectivamente. Há, ainda, microrganismos que possuem interdependência com outros microrganismos (FISHER, 1990 apud MUYZER; SMALLA, 1998).

As técnicas usuais de método indireto para determinação quantitativa da diversidade microbiana continuam indispensáveis, mas subestimam a grande diversidade microbiana das amostras do solo (ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Um grama de solo pode abrigar 10 bilhões de microrganismos, de possivelmente milhares de espécies (ROSELLÓ-MORA e AMANN, 2001) e menos de 1% daqueles observados em microscópio podem ser cultivados e caracterizados, tornando o solo um ambiente desconhecido (TORSVIK e OVREAS, 2002).

Neste sentido, o solo pode ser considerado uma “caixa preta”, sendo que muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem estudos visando a identificação de seus componentes abióticos e, principalmente bióticos, além da interação entre estes e sua participação nos processos do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

3.3. Técnicas moleculares para análise da diversidade microbiana do solo

Técnicas de genética molecular, como isolamento e caracterização do DNA total e amplificação deste através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de genes funcionais, têm sido usadas em estudos de comunidades microbianas, para superar as limitações encontradas para a avaliação da microbiota ambiental, através do uso de técnicas convencionais de isolamento e cultivo em laboratório.

É nesse contexto científico que surge uma nova área interdisciplinar denominada Ecologia Molecular Microbiana. O isolamento de DNA microbiano do ambiente natural encontra-se como um instrumento útil para o estudo da diversidade presente nos ecossistemas, para a descoberta de espécies “não cultiváveis”, na detecção de organismos geneticamente modificados e no estudo das funções ecológicas de certos genes que codificam importantes atividades metabólicas (TSAI e OLSON, 1991).

De acordo com Rosado et al. (1997), os principais fatores responsáveis pelo surgimento desta área são os avanços nas técnicas de biologia aliados ao surgimento da bioinformática, uma vez que o uso de técnicas baseadas nas ferramentas moleculares permite estudar a microbiota, baseando-se no uso de ácidos nucleicos.

Uma das molas impulsoras dos avanços ocorridos no campo da Ecologia Molecular Microbiana tem sido a necessidade cada vez maior da indústria biotecnológica em obter informações sobre produtos com potencialidade para serem colocados no comércio. Segundo Bull et al. (2000), a indústria da biotecnologia almeja que, com o maior conhecimento da diversidade global de microrganismos no ambiente, poderá ter acesso aos mesmos ou aos seus componentes, que poderão se tornar produtos para serem colocados no mercado.

A quantidade de microrganismos em um grama de solo é vasta, e cada um deles encerra em seu genoma uma média de 2 milhões de pares de bases nucleotídicas. Não é possível sequenciar todas as moléculas de DNA presentes na solução do solo extraída para avaliação de toda a diversidade do solo. Por isso é utilizada uma seqüência do genoma extraído do solo, de tamanho relativamente pequeno, conservado na maioria dos microrganismos, na qual é possível analisar e caracterizar as espécies de forma filogenética, como a seqüência 16S do DNA ribossômico, no caso dos estudos de procariontes (COUTINHO, 1999).

O gene 16S rDNA, que codifica os RNA ribossômicos 16S, componente da subunidade 30S dos ribossomas, sítio de ocorrência da síntese de proteínas em todos os microrganismos, tem uma história evolutiva muito antiga. Suas seqüências têm trechos altamente conservados, ou seja, ocorrem em quase todos os microrganismos. É possível, a partir dessas seqüências, elaborar *primers* (iniciadores) chamados universais para regiões

conservadas no início e no final do gene. Estes *primers* podem ser usados para amplificar, via PCR, as seqüências internas do gene, contendo regiões variáveis (COUTINHO, 1999; NAKATSU et al., 2000). Além do 16S rDNA, outros genes também são utilizados para análise de diferentes grupos de microrganismos, como o gene 28S rDNA e 18S rDNA, aplicados na análise da comunidade de eucariontes de amostras do ambiente (SMIT et al., 1999; SIGLER e TURCO, 2002).

Heuer et al. (1997) utilizaram um grupo específico de *primers* para PCR e aplicaram a técnica de DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) para analisar comunidades de actinomicetos em diferentes solos. Curtis e Craine (1998) usaram DGGE para comparar a diversidade de comunidades microbianas totais presentes em diferentes amostras de lodo. Na técnica de DGGE, as moléculas com diferentes seqüências têm diferentes comportamentos, assim param a migração em diferentes pontos do gel.

A separação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR em DGGE é baseada no decréscimo da mobilidade eletroforética, a partir da desnaturação das moléculas de DNA em gel de poliacrilamida, contendo um gradiente linear de desnaturantes (mistura de uréia e formamida) (MUYZER e SMALLA, 1998). No DGGE e TGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Temperatura), a separação dos amplicons é realizada através da diferença da seqüência amplificada que mantém sua estabilidade em diferentes graus de desnaturantes ou temperatura (TIEDJE et al., 1999). Essa técnica tem sido usada para determinar a diversidade genética de amostras de comunidades microbianas, sem, porém caracterizar e classificar taxonomicamente as espécies (TORSVIK e OVREAS, 2002).

Para a análise por T-RFLP (Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminal), são utilizados *primers* marcados com fluorescência para a reação de PCR, os fragmentos de DNA amplificados são cortados por enzimas de restrição em sítios específicos, e o tamanho dos fragmentos produzidos é constante em um indivíduo, mas varia entre as espécies devido às diferenças nas seqüências não codificantes do DNA. Os fragmentos de DNA produzidos pelas enzimas de restrição podem ser separados segundo o tamanho, por eletroforese em gel de agarose. O resultado é um rastro de fragmentos de DNA no gel, que apresentarão diferentes intensidades de fluorescência podendo-se assim avaliar diferenças na diversidade entre solos ou ambientes (TIEDJE et al., 1999).

Além das técnicas citadas anteriormente, outras metodologias têm sido utilizadas na análise microbiana do solo, como por exemplo, SSPC (Conformação de Polimorfismo em Fita Simples), ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado) (TORSVIK e OVREAS, 2002). Todas essas técnicas envolvem a análise dos produtos de PCR com *primers* universais, e se diferenciam pela forma com que os produtos são separados para a avaliação. A técnica de SSPC separa os produtos de PCR pelas diferenças na mobilidade eletroforética causada por diferenças conformacionais da fita simples da seqüência amplificada de DNA (STACH et al., 2001). Outras técnicas moleculares utilizadas no estudo microbiológico do solo constam de reações de hibridização e sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados.

3.4. Extração de DNA microbiano do solo

Vários métodos de extração de DNA de solo já estão disponíveis na literatura (SMALLA et al., 1993; SAANO et al., 1995; VIESTEL, 1995; BERTHELET et al., 1996; CULLEN e HIRSCH, 1998; KUSKE et al., 1998; SELBACH, 1998; YEATES et al., 1998; RANJARD et al., 1998; MILLER et al., 1999; KRSEK e WELLINGTON, 1999; FROSTEGARD et al., 1999; DIREITO et al., 2001; NIEMI et al., 2001; ROOSE-AMSALEG et al., 2001; BURGMANN et al., 2001; LaMONTAGNE et al., 2002; WECHTER et al., 2003; ROBE et al., 2003; MUMY e FINDLAY, 2004; LIPTHAY et al., 2004).

Em geral, os métodos envolvem a lise das células microbianas presentes nas amostras de solo para a liberação do material genético (DNA), seguido de sua purificação, para uso em reações de PCR, sequenciamento, hibridização, entre outros. O DNA “do solo” contém cromossomos de um grande número de microrganismos presentes na amostra analisada. Quanto maior a diversidade microbiana do solo, maior o número de seqüências diferentes encontradas nos cromossomos recuperados do solo (COUTINHO, 1999).

Vários autores têm chamado a atenção para as dificuldades de se realizar estudos de ecologia microbiana do solo, devido às inúmeras limitações apresentadas por esse

ambiente (HOLBEN, 1997; WINTZINGERODE et al., 1997; BULL et al., 2000; DANIEL, 2005; HE et al., 2005; DONG et al., 2006).

Os métodos para extração de DNA do solo podem ser divididos em dois tipos: método indireto, no qual as células microbianas são extraídas do solo por centrifugação e, a partir disso, sofrem a lise e extração dos ácidos nucléicos; e o método direto, que consiste na extração do DNA diretamente das células, ainda na matriz do solo.

O método indireto é pouco aplicado, pois permite baixo rendimento na extração de DNA, sendo também pouco representativo, uma vez que muitas células ficam retidas nas partículas do solo e não têm seu DNA extraído e analisado. As células bacterianas extraídas do solo por esse método representam apenas 25 a 50% do total da comunidade endógena do solo (BAKKEN e LINDAHL, 1995), além de esse método ser muito trabalhoso dispendendo de muito tempo para sua execução.

Duarte et al. (1998) desenvolveram um método para extração de DNA e RNA do solo com uma etapa inicial de extração das células da matriz do solo antes da lise celular, e obtiveram DNA e RNA de ótima qualidade para a análise das espécies bacterianas de diversos tipos de solos. Esses autores relataram, porém, que a extração direta permite maior rendimento, e conseqüentemente uma análise mais significativa dos microrganismos pertencentes ao solo.

O método direto possui como vantagens o fato de ser mais rápido e utilizar amostras pequenas de solo, o que garante maior repetitividade, sendo essa característica muito importante para esse tipo de análise, uma vez que quanto maior o número de amostras analisadas, maior a representatividade.

Outra característica positiva desse tipo de técnica é o maior rendimento de DNA nas extrações. Kozdrój e Van Elsas (2000) testaram diferentes métodos, direto e indireto, para a extração de DNA do solo, e observaram que o método direto leva a um maior rendimento de DNA, seguido pelo método indireto que, apesar de não render a quantidade de DNA desejada, alcançou menores concentrações de contaminantes, como ácidos húmicos e proteínas. Courtois et al. (2001) obtiveram rendimento de DNA de 38 a 59 µg DNA/g solo seco para o método de extração direta de DNA do solo, enquanto que para o método indireto o rendimento não ultrapassou 428 ng de DNA/g solo seco.

Há porém desvantagens, pelo fato da extração ser realizada diretamente da matriz do solo. A co-extração de compostos húmicos, como ácidos húmicos e fúlvicos é um dos pontos agravantes e de difícil solução, uma vez que esses compostos não são retirados facilmente da solução extraída e podem prejudicar as análises do DNA, como PCR e reações de hibridização.

Outra desvantagem do método de extração de DNA direta do solo é a adsorção deste às partículas do solo e sua conseqüente perda, principalmente em solos argilosos. Cebolla et al. (1995) estudando a adsorção do DNA em diferentes solos, observaram que fragmentos menores de DNA, de 2,69 Kb, são sorvidos ao solo melhor que fragmentos grandes de 23 Kb. O DNA pode ser adsorvido às argilas ou pode formar complexos organo-minerais com as partículas do solo (TREVORS, 1996). De acordo com Frostegard et al. (1999), os níveis de adsorção e extração do DNA estão diretamente relacionados à composição do solo, e solos argilosos apresentam maiores dificuldades de extração.

A presença de colóides no solo com cargas elétricas e com capacidade de adsorver as moléculas de DNA, apresenta-se como um fator limitante. Isto se deve ao fato do mesmo permanecer aderido às partículas do solo, durante a etapa de lise celular. Esta interação tem contribuído para a perda da eficiência de diversas técnicas de extração de DNA do solo, fazendo com que seja necessária a neutralização das cargas das partículas do solo (VOLOSSIOUK et al. 1995; FROSTEGARD et al., 1999; FORTIN et al., 2004).

As técnicas desenvolvidas para a extração direta do DNA do solo podem ser divididas em etapas comuns, que são: preparo da solução do solo, lise celular, remoção de fragmentos celulares (proteínas, lipídeos e polissacarídeos), precipitação do DNA e purificação da solução. Cada etapa pode ser realizada com diferentes tipos de reagentes, equipamentos e princípios. O primeiro passo para a extração do DNA do solo, como para qualquer análise de solo, é a amostragem. O solo é um ecossistema extremamente heterogêneo, e essa característica faz com que seu estudo seja difícil, sendo, portanto, importante o grande número de repetições, para maior representatividade na análise microbiológica.

Após a amostragem, o solo deve ser preparado através de um peneiramento e pesado. Em algumas técnicas é realizada uma etapa de maceração do solo, com o objetivo

de homogeneizá-lo, romper as partículas e liberar as células que podem estar ligadas à matriz do solo (FROSTEGARD et al., 1999). Essa maceração é realizada em almofariz com pistilo e, em alguns casos é também utilizado o nitrogênio líquido, que, além de auxiliar o rompimento dos grânulos, também inicia a lise das células microbianas para a liberação dos ácidos nucléicos.

A solução do solo é preparada com a adição de tampão, que pode ser de fosfato de potássio, ou de fosfato de sódio, ou ainda outros tipos constituídos de diferentes concentrações de EDTA e Tris-HCl, e também metodologias nas quais adiciona-se ao tampão enzimas (proteínase K, lisozima) ou detergentes (SDS) para a lise microbiana (KRSEK e WELLINGTON, 1999).

Quanto menor a amostra do solo, menor a quantidade de reagente a ser utilizada, mais rápido o processo de extração e mais amostras podem ser analisadas, o que é desejável. Por isso as amostras de solo utilizadas nos mais recentes estudos desenvolvidos para extração de DNA de solo variam de 0,25 a 0,5g (AGNELLI et al., 2004; ROSA et al., 2005; DONG et al., 2006).

Frostegard et al. (1999) estudaram diferentes valores de pH para tampão inicial de extração, e observaram que o aumento do valor de pH acresce o rendimento de extração de DNA do solo, e obteve 31 % de rendimento com tampão de pH 6,0 e 82 % de rendimento com pH 9,0.

O tampão inicial é muito importante e pode melhorar o rendimento da extração. Krsek e Wellington (1999) testaram a eficiência de diferentes tampões na extração de DNA diretamente do solo, e encontraram diferenças significativas no rendimento de DNA, sendo que o tampão 50/50 (Tris-HCl 50 mM e EDTA 50 mM) foi mais eficiente. O mesmo resultado foi obtido por Rosa et al. (2005), que testando diferentes tampões para a otimização da técnica de Wechter (2003), encontraram no tampão 50/50 o maior rendimento na extração de DNA de solos de área de clima tropical.

LaMontagne et al. (2002) estudaram diferentes concentrações de NaCl no tampão inicial de extração e verificaram que a quantidade de ácidos húmicos observada foi inversamente correlacionada ao aumento da concentração do sal, porém não observaram diferenças no rendimento de extração de DNA entre as concentrações de sal estudadas.

Algumas técnicas incluem uma etapa de “limpeza do solo” antes da lise das células (SELBACH, 1998; DIREITO et al., 2001). Essa limpeza tem como objetivo a eliminação de DNA extracelular que pode estar retido na matriz do solo por algum tempo e interferir nas análises microbianas. Também é realizada a eliminação de uma porcentagem dos ácidos húmicos da amostra de solo, que é o principal contaminante nas extrações de DNA.

A técnica de Selbach (1998) possui esta etapa de limpeza que é realizada a partir da adição de um tampão fosfato de sódio (120 mM) à amostra de solo e a aplicação de agitação a 200 rpm. Em seguida, a amostra é centrifugada em velocidade moderada, e o sobrenadante é eliminado. Esta técnica oferece bons resultados no rendimento do DNA extraído de solos de área de clima tropical (SANTOS, 2002).

Em trabalho recente (HE et al., 2005) foi observado que o uso de tampões para a “limpeza” do solo pré-lise na técnica de Zhou et al. (1996), aumentou o rendimento de DNA extraído em 24 % e diminuiu o conteúdo de ácidos húmicos co-extraídos em 31 %, possibilitando a realização de PCR. De acordo com os mesmos autores, a introdução da etapa de limpeza pré-lise foi baseada na idéia de que a limpeza pode promover a dispersão e homogeneidade do solo, diminuindo a adsorção do DNA nas partículas de solo, removendo cátions covalentes e compostos orgânicos que são facilmente dissolvidos na amostra de solo e prejudicam a extração do DNA. Para os autores, essa etapa deve ser incluída na extração do DNA de solos que contêm alto conteúdo de matéria orgânica e que são ricos em ácidos húmicos.

A lise das células é a etapa mais crítica de todo o processo de extração de DNA diretamente do solo. De acordo com Frostegard et al. (1999) um procedimento eficiente de lise celular deve alcançar todas as células de todos os tipos, incluindo esporos e outras estruturas com paredes celulares resistentes. Uma lise eficiente ocorre graças a um bom preparo da solução do solo, e pode ser fortemente influenciada pela composição do mesmo, dependendo das constituições de argila e matéria orgânica, uma vez que os microrganismos interagem fortemente com os colóides do solo formando agregados, que protegem as células contra a ação realizada para o seu rompimento (ZHOU et al., 1996; BURGMANN et al., 2001).

Através da literatura acima, citada verifica-se que a etapa de lise celular microbiana consiste no rompimento da parede celular e membranas dos microrganismos para a liberação do DNA no processo de extração. Para a escolha do melhor método de lise é necessário se conhecer os objetivos do trabalho. Se o que se quer analisar é um determinado microrganismo presente no solo, é possível realizar um estudo sobre a parede celular e as membranas e facilmente realizar a escolha do tipo de lise específica e sua intensidade. Para a extração do DNA microbiano total, é difícil estabelecer a intensidade da lise a utilizar, pois há no solo milhares de microrganismos com diferentes características, e principalmente, com diversas espessuras e resistências em sua parede celular e membranas. É fato que as células gram-negativas são rompidas facilmente, porém força maior é necessária para a lise das células gram-positivas, pois estas possuem parede celular muito mais espessa. Ao utilizar eficiente método para lise celular de bactérias gram-positivas, além do rompimento das células gram-negativas, pode ocorrer dano no seu DNA, o que dificulta a análise deste grupo microbiano.

Há três tipos de lise celular: química, enzimática e mecânica. A lise química, geralmente, consiste no uso de detergentes que atuam dissolvendo o material hidrofóbico da membrana celular. O agente químico mais utilizado neste tipo de lise é o SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), com concentrações que variam de 10 a 20 % e combinado à alta temperatura, a qual melhora seu efeito no rompimento da célula (SELENSKA e KLINGMULLER, 1991).

A lise enzimática é amplamente utilizada nas técnicas de extração de DNA diretamente do solo, e as enzimas mais utilizadas para isso são proteinase K e lisozima. A lisozima age na hidrólise de peptídeos e polissacarídeos presente na parede celular de bactérias e que dá rigidez e proteção osmótica à célula (TSAI e OLSON, 1991; TEBBE e VAHJEN, 1993). A proteinase K é uma protease que atua na hidrólise da porção protéica da membrana celular (PORTEOUS e ARMSTRONG, 1991; ZHOU et al., 1996).

O uso do ultra-som para a lise das células é bastante difundido e pode ser empregado em associação com outros métodos de lise. Porém é necessário avaliar o equipamento utilizado e os valores de potência a serem empregados (PICARD et al., 1992; PORTEOUS et al., 1997). Tratamentos mecânicos são mais efetivos, menos seletivos e os

mais empregados são maceração do solo com nitrogênio líquido, choque térmico, ultrassom, e *bead beating*. A maceração do solo com nitrogênio líquido é realizada em almofariz e com o uso de pistilo, auxiliando a lise das células microbianas, homogeneizando as partículas do solo e rompendo aglomerados os quais podem guardar células microbianas. A maceração do solo permite o acesso às células que, sem esta etapa, não seriam rompidas e seus DNA genômicos não seriam analisados (RANJARD et al., 1998).

O choque térmico é um método de lise mecânico bastante empregado na extração de DNA do solo em conjunto com técnicas de lise química e enzimática. A técnica consiste em congelamento e descongelamento da amostra, podendo o primeiro ser realizado em *freezer* (- 20 °C) (VIESTEL, 1995) ou, de forma mais efetiva, com o uso de nitrogênio líquido (- 196 °C) (SELBACH, 1998; DIREITO et al., 2001). Já para o descongelamento da amostra, utiliza-se o banho-maria em temperatura de 65 °C.

Ações químicas e enzimáticas para a lise das células apresentam uma intensidade moderada e geralmente não causam danos ao DNA durante sua extração, porém agem de forma seletiva em alguns tipos de células, discriminando outras, não participando da liberação do material nuclear de todos os microrganismos presentes no solo. A lise mecânica atua de forma mais ativa e uniforme no rompimento das células e ajuda na dispersão das partículas do solo, permitindo, assim, maior penetração dos agentes químicos e físicos durante a lise. A desvantagem, porém, é a tendência em danificar o DNA recém liberado das células (ROBE et al., 2003).

Finalmente, o *bead beating* é um dos métodos de lise mais empregado para a extração de DNA diretamente do solo (ROBE et al., 2003). Este método consiste no uso de pérolas de vidro (*glass beads*) de diferentes tamanhos (0,1 mm até 2 mm) que são adicionados à amostra de solo e esta sofre uma agitação, para que as contas se choquem com as células microbianas causando seu rompimento. De acordo com diversos trabalhos (MORÉ et al. 1994; KRSEK e WELLINGTON, 1999; MILLER et al., 1999; LIPTHAY et al., 2004) o método *bead beating* mostrou ser o mais eficiente para a lise celular de diferentes tipos de microrganismos de diferentes tipos de solo.

Lipthay et al. (2004) observaram que o aumento no tempo de *bead beating* eleva o rendimento de extração de DNA do solo, porém pode haver danos no DNA e este pode ser

extraído na forma de fragmentos menores. Os autores sugerem que o método seja substituído por outro, se o objetivo do trabalho for a extração de DNA de grande peso molecular. O método *bead beating* é também empregado em diversos kits comerciais para extração de DNA do solo, porém também é o método que causa maiores danos ao DNA extraído.

As etapas de desproteínização e remoção de contaminantes da amostra são importantes, e destas depende a pureza do DNA que será recuperado. A forma clássica utilizada por muitos pesquisadores, é o uso de solventes orgânicos, como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (SMALLA et al., 1993; VIESTEL, 1995). Estes mostram eficiência na desproteínização, porém estão sendo substituídos por outros reagentes, devido à alta toxicidade.

Técnicas mais atuais utilizam soluções salinas com altas concentrações, como por exemplo, solução de cloreto de potássio, acetato de amônio, acetato de potássio, acetato de sódio ou cloreto de sódio. O uso de uma dessas soluções seguida de centrifugação permite a precipitação de proteínas e outros fragmentos da célula, enquanto o DNA permanece no sobrenadante (CULLEN e HIRSCH, 1998; WECHTER et al., 2003).

Após a desproteínização da amostra, o DNA está pronto para ser precipitado e separado dos outros reagentes presentes na solução. A precipitação geralmente é realizada através do uso de diferentes tipos de álcoois, como por exemplo, etanol ou isopropanol, ou ainda com o uso de polietilenoglicol (PEG). De acordo com Cullen e Hirsch (1998), o isopropanol é o mais indicado para a precipitação do DNA, apresentando os melhores resultados se comparado ao etanol ou PEG. O etanol pode ser utilizado em uma etapa posterior à precipitação para a lavagem do precipitado formado, antes da ressuspensão do DNA, esta realizada com tampão TE (Tris – EDTA), para então ser armazenado até sua análise, ou até a etapa adicional de purificação.

Alguns pesquisadores conseguiram superar esse problema através da diluição da solução de DNA contaminada com ácidos húmicos, uma vez que não é necessária grande quantidade de DNA para a realização de PCR. Em alguns casos, porém, a diluição não é suficiente e a aplicação de uma etapa adicional de purificação é indispensável (JUNIPER et al., 2001). A etapa de purificação é crítica, porém necessária para a extração de DNA de

solos com altos teores de matéria orgânica, sendo a principal causa de perdas de DNA. Os principais contaminantes a serem retirados das amostras são os ácidos húmicos, que possuem características similares aos ácidos nucléicos e podem diminuir a sensibilidade ou até mesmo impedir análises no DNA extraído, como PCR e reações de hibridização (FORTIN et al., 2004; HE et al., 2005).

Os ácidos húmicos interferem na reação de PCR através da quelação dos íons magnésio, requeridos pela enzima Taq polimerase, ou através da adsorção dos *primers* pelo ácido, reduzindo a sensibilidade de detecção da seqüência (TSAI e OLSON, 1992). A complexidade química dos ácidos húmicos torna esses compostos difíceis de serem retirados na purificação do DNA, sendo esse processo, na sua maioria, trabalhosa e demorada (TREVORS e VAN ELSAS, 1989; ROMANOWSKI et al., 1992 apud BRAID et al., 2003).

De acordo com Dong et al. (2006), a principal razão para a difícil remoção das substâncias húmicas da solução de DNA é provavelmente a estrutura química similar desses dois materiais. Ambos têm moléculas de cadeias longas e cargas negativas, sendo que os ácidos húmicos apresentam muitos grupos carboxila e hidroxila, e suas características físico-químicas são semelhantes aos grupos fosfatos presentes na cadeia do DNA.

Muitos métodos têm sido utilizados para eliminar substâncias húmicas do DNA extraído diretamente do solo, como tratamentos com colunas de hidroxiapatita (TORSVIK, 1980), centrifugação com cloreto de céσιο (HOLBEN et al., 1988; WALIA et al., 1990; LOVELL e PICENO, 1994; LEFF et al., 1995), cromatografia de troca iônica e exclusão por tamanho (ERB e WAGNER-DOBLER, 1993; LEFF et al., 1995; KUSKE et al., 1998; HURT et al., 2001), eletroforese em gel de agarose seguida do corte da banda com o DNA (MALIK et al., 1994; MORE et al., 1994; ZHOU e TIEDJE, 1995), CTAB (ZHOU et al., 1995; CHO et al., 1996) e PVPP (polivinilpolipirrolidone) (ZHOU et al., 1996; FROSTEGARD et al., 1999). Esses procedimentos geralmente resultam em perdas de DNA e, possivelmente, eliminam DNA genômico alvo de comunidades complexas (BRAID et al., 2003).

É importante observar alguns pontos chave na extração de DNA de solo. Cada técnica utilizada difere na eficiência do rendimento de extração em diferentes tipos de solo (ZHOU et al., 1996; FROSTEGARD et al., 1999; MILLER et al., 1999). De acordo com alguns autores (KOZDRÓJ e VAN ELSAS, 2000; WESTERGAARD et al., 2001), a escolha da técnica de extração do DNA do solo determina qual composição da comunidade microbiana será obtida. O uso de diferentes técnicas de extração de DNA do solo pode ser necessário para a obtenção da real diversidade microbiana do solo estudado (LIPTHAY et al., 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem do solo

O solo utilizado neste estudo foi um latossolo vermelho eutrófico, amostrado em área agrícola, sob cultura de cana-de-açúcar, localizado na cidade de Valparaíso, estado de São Paulo, a 577 km a noroeste da capital, altitude de 449 m, e coordenadas geográficas de 21°07'45" – 21°26'55" latitude sul e 51°06'29" – 50°47'21" longitude oeste. A cidade de Valparaíso tem 10.790,78 hectares cultivados com cana-de-açúcar, sendo que os solos estudados foram coletados em área pertencente à Usina Univalem. A região apresenta verão quente e úmido com precipitações maiores no período de novembro a março. A litologia é composta pelo grupo Bauru e São Bento.

As amostras de solo foram coletadas de áreas sob cultivo de cana-de-açúcar com dois diferentes manejos: manejo convencional e manejo orgânico. O solo no cultivo orgânico recebeu aplicação de resíduos da indústria sucroalcooleira e composto orgânico.

Há uma parceria da usina Univalem com a empresa alimentícia Ajinomoto, localizadas em área vizinha uma à outra. Os resíduos produzidos pela empresa alimentícia são submetidos a um tratamento do tipo compostagem, no qual se utiliza também esterco de gado confinado. O composto mais outros resíduos, juntamente com a vinhaça gerada pela usina, são usados no tratamento do solo da cultura de cana-de-açúcar, sob manejo orgânico.



Figura 1. Esquema da parceria Usina Univalem e empresa Ajinomoto para produção do adubo orgânico obtido através da compostagem de esterco e resíduos das indústrias, e aplicado nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar orgânico (PLANETA ORGÂNICO, 2005).

O controle de pragas na área é realizado através da prática de controle biológico. Não há a aplicação de adubos químicos solúveis e defensivos (inseticidas e herbicidas), como ocorre no manejo convencional.

A amostragens de solo foram realizadas no mês de abril de 2005, em dia ensolarado. Das duas áreas de estudo (solo sob manejo orgânico e solo sob manejo convencional) foram coletadas oito amostras simples de solo, de 100 g cada, de 0 a 20 cm de profundidade. Antes, contudo, foram retirados os restos de matéria orgânica vegetal presentes na superfície do solo da cultura de cana-de-açúcar. As amostras simples de cada uma das duas áreas de estudo foram reunidas e homogeneizadas através de peneiramento, formando assim duas amostras compostas, uma de cada tipo de solo.

4.2. Análises das amostras de solo

4.2.1. Análise química e física do solo

As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Química e Fertilidade do Solo para a realização de análise química básica, e para o Laboratório de Física do Solo, onde foi avaliada a textura dos solos estudados (porcentagem de areia, argila e silte). Estas análises

foram realizadas nos laboratórios pertencentes ao Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos, *campus* de Araras, estado de São Paulo.

4.2.2. *Teor de umidade do solo*

Foram consideradas três amostras de cada tipo de solo, sendo estas pesadas, levadas à estufa a 110 °C até peso constante (aproximadamente 24 horas). O cálculo do teor de umidade foi feito através da diferença do peso do solo antes e depois da secagem na estufa, sendo o valor transformado em porcentagem de umidade.

4.2.3. *Análise da biomassa microbiana do solo*

A análise da biomassa microbiana dos solos estudados foi realizada através da técnica de Irradiação – Extração (FERREIRA et al., 1999). O solo sofre irradiação em microondas, e, após a morte dos microrganismos do solo, são realizadas a extração e quantificação do carbono orgânico presente no solo, isto é, a quantidade de carbono orgânico resultante da morte microbiana no solo, comparada ao teor de carbono orgânico sem irradiação. Os resultados foram expressos em µg de carbono por grama de solo. O carbono orgânico foi avaliado através da metodologia descrita por Vance et al. (1987).

4.3. Técnicas de extração de DNA do solo

Foram utilizadas dez metodologias distintas para a extração do DNA de solo, citadas por:

- Smalla et al. (1993) (SMA);
- Viestel (1995) (VIE);
- Saano et al. (1995) (SAA);
- Cullen e Hirsch (1998) (CUL);
- Selbach (1998) (SEL);
- Tsai (1999) (TSA);

- Direito et al. (2001) (DIR);
- Wechter et al. (2003) (WEC),
- Metodologia Proposta (PRO);
- Kit Comercial (KIT).

As técnicas SMA, CUL, SEL e DIR foram testadas a partir da modificação proposta por Santos (2002). A técnica WEC foi testada a partir de modificações realizadas por Rosa et al. (2005). Para cada técnica foram realizadas as extrações em triplicatas, de cada solo testado (solo de manejo orgânico e solo de manejo convencional). A seguir estão detalhadas as técnicas utilizadas neste presente estudo.

4.3.1. Técnica SMA

Uma amostra de solo de 0,25 g foi colocada em microtubo de 1,5 ml, sendo adicionados 375 µl de tampão fosfato de sódio pH 8,0 (0,12 M) e 0,5 ml de pérolas de vidro de 0,1 mm de diâmetro. Posteriormente, esse material foi submetido a três ciclos de 90 segundos de “*bead beater*”, isto é, agitação em aparelho vórtex, com intervalo de 10 segundos entre cada ciclo. Em seguida, foi adicionado SDS 10% para uma concentração final igual a 1,2%, e a amostra foi incubada a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Foram adicionados 375 µl de fenol saturado com Tris-HCl, seguindo-se de centrifugação a 11750 x g por 5 minutos para a recuperação da fase aquosa. Nova extração foi realizada através da adição de um volume de clorofórmio álcool – isoamílico, misturado manualmente, recuperando-se a fase aquosa. Foram adicionados 1/10 do volume de NaCl (5,0 M) e dois volumes de etanol 96%. Esta mistura foi mantida a – 20 °C por 1 hora, sendo posteriormente centrifugada por 15 minutos a 735 x g a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensado em etanol gelado 70%, centrifugado novamente, e o novo precipitado submetido à secagem. Finalmente, o precipitado foi ressuspensado em 100 µl de tampão TE, e a solução armazenada a – 20 °C. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 2.

4.3.2. Técnica VIE

A amostra de solo de 0,25 g foi misturada a 750 µl de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0, em microtubos de 1,5 ml, e agitada a 200 rpm por 10 minutos em agitador rotatório, a temperatura de 30 °C. Logo após, adicionaram-se 125 µl de SDS 20%, sendo o conjunto homogeneizado a 200 rpm, em agitador orbital (*shaker*), por 15 minutos a 59 °C. Foi executado um ciclo de congelamento a – 20 °C por 1 hora e descongelamento em banho-maria a 60 °C por 5 minutos, para permitir a lise celular. Após esse ciclo, 125 µl de fenol saturado com tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 foram adicionados, e a amostra foi misturada em agitador tipo vórtex por 1 minuto, de forma a se obter uma emulsão. A mistura foi centrifugada a 4000 x g por 15 minutos, e a fase aquosa separada. Foi adicionado 1 ml da mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) seguida de agitação em vórtex por 20 segundos para formar uma emulsão, sendo em seguida centrifugada a 6000 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi novamente separada e foi adicionado 1 ml de mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), misturando-se em vórtex por 10 segundos. A mistura foi submetida à centrifugação a 4000 x g por 5 minutos e a fase aquosa coletada novamente e precipitada com etanol, sendo que as amostras foram deixadas a – 20 °C por 24 horas. O precipitado foi obtido após centrifugação a 12000 x g por 10 minutos. Esse precipitado foi lavado com etanol 70% gelado, e seco a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A ressuspensão do precipitado foi realizada com 100 µl de tampão TE, e a solução foi armazenada a – 20 °C. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 3.

4.3.3. Técnica SAA

A cada amostra de 0,25 g de solo foram adicionados 625 µl de solução de lise contendo tampão fosfato de sódio (0,12 M pH 8,0), 1% de SDS e 100 µl/ml de proteinase K. A mistura foi homogeneizada e ficou incubada por uma hora a temperatura de 37 °C. Foram adicionados 120 µl de cloreto de sódio (5 M) preparado em tampão CTAB. Realizou-se, novamente a homogeneização da amostra e adicionaram-se 94 µl de CTAB 10% em 0,7 M NaCl. A mistura foi incubada a 65 °C por 20 minutos, para a completa

desnaturação das proteínas e liberação dos polissacarídeos ligados ao DNA. A amostra foi centrifugada por 15 minutos a 9000 x g. Coletou-se o sobrenadante, que foi transferido a um novo tubo e adicionou-se um volume de isopropanol. Misturou-se bem a amostra e esta foi incubada por uma hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após este período, realizou-se a centrifugação por 15 minutos a 10000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi lavado com 300 μl de etanol 70 %, seco ao ar. O precipitado foi ressuspense em 100 μl de tampão TE, e a solução foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 4.

4.3.4. Técnica CUL

A cada amostra de solo de 0,25 g, foram adicionados 750 μl de tampão fosfato de sódio pH 8,0 (120 mM), 75 μl de SDS 10% e 0,5 ml de pérolas de vidro de 0,1 mm de diâmetro. Esse material foi submetido por 30 segundos à etapa de “*bead beater*” utilizando-se agitador vórtex, sendo em seguida centrifugado a 16000 x g por cinco minutos. Ao sobrenadante coletado foram adicionados EDTA pH 8,0 (0,5 M) até a concentração final de 100 mM e acetato de potássio pH 8,0 (5,0 M), para se obter a concentração final de 500 mM. O material foi deixado em gelo por 20 minutos, sendo então submetido a uma centrifugação a 16000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente coletado e recebeu um volume de tampão fosfato de sódio pH 8,0 (120 mM) contendo 4% de PVPP (polivinilpolipirrolidone), e submetido a uma agitação de 30 minutos para precipitar ácidos húmicos e fúlvicos. Após a centrifugação de 16000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e acrescentou-se 1 volume de isopropanol. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com etanol 80% e submetido à secagem. O DNA foi então ressuspense em 100 μl de tampão TE e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 5.

4.3.5. Técnica SEL

A cada amostra de solo de 0,25 g foram adicionados 500 µl de tampão fosfato (120 mM, pH 8,0) e submetidos a uma agitação orbital a 200 rpm durante 10 minutos. Em seguida, esse material foi centrifugado a 2.940 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida foram adicionados 500 µl da solução de lise (0,01 M Tris HCl, pH 8,0; lisozima 10 mg/ml) contendo CaCl₂ (para resultar numa concentração de Ca⁺² equivalente a 60 a 90% da CTC do solo medido em pH 8,0) e incubado por uma hora à 37 °C com agitação a cada 15 minutos. No fim desse período, foi adicionada proteinase K, para se ter uma concentração final igual a 200 µg/ml e a solução foi incubada sob as mesmas condições anteriores. Logo depois, foram acrescentados 500 µl de solução de SDS (0,1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 10% [peso/volume] SDS) e a mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 5 segundos e então submetida a três ciclos de congelamento (-196 °C em nitrogênio líquido) e descongelamento (a 65 °C em banho-maria). A solução foi misturada e centrifugada a 1650 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foi adicionado EDTA ao sobrenadante para se ter uma concentração final igual a 20 mM. Finalmente, o DNA foi precipitado utilizando-se 0,6 volumes de isopropanol e incubando a -20 °C de um dia para o outro (aproximadamente 12 horas). Após esse período, a amostra foi centrifugada a 16000 x g por 5 minutos e o precipitado formado foi lavado com etanol 70% e ressuspensão com 100 µl de tampão TE, e estocado a -20 °C. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 6.

4.3.6. Técnica TSA

A cada amostra de 0,25 g de solo foram adicionados 400 µl de tampão fosfato de sódio (0,12 M) pH 8,0, com 1 % de PVPP, mais 40 µl de CTAB 10%. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e adicionaram-se 250 µl de fenol saturado com Tris-HCL. A mistura foi novamente agitada em vórtex por 30 segundos e incubada por 20 minutos a temperatura ambiente (\pm 25 °C), sendo agitada a cada 5 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado e colocado em um novo tubo. Foram adicionados 250 µl de fenol e a mistura foi agitada por 30 segundos e

centrifugada a 12000 x g por 5 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 350 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada e centrifugada por 5 minutos a 12000 x g. Para a precipitação do DNA foi realizada a substituição do polietilenoglicol (PEG) por um volume de isopropanol, mantendo a adição de 1/10 do volume de NaCl 5 M, como na técnica original. A amostra foi agitada para misturar bem os reagentes e foi incubada por 30 minutos no gelo. Após este período, a amostra sofreu centrifugação a 12000 x g por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado formado foi lavado com etanol 70%, seco ao ar, e ressuspensão em 100 µl de tampão TE. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 7.

4.3.7. Técnica DIR

Nessa técnica foram realizadas algumas modificações a partir da técnica desenvolvida por Selbach (SEL). As mudanças constam da adição de PVPP (4%) ao tampão fosfato de sódio utilizado no início da extração, seguido de agitação em vórtex por 30 segundos. A última modificação foi o aumento da concentração de lisozima utilizada para 20 mg/ml. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 8.

4.3.8. Técnica WEC

Em tubo para microcentrífuga de 1,5 ml foi colocado 0,25 g de solo, misturado a 0,5 ml de pérolas de 0,1 mm de diâmetro, 250 µl de tampão 50/50 (EDTA 50 mM pH 8 e Tris-HCl 50 mM pH 8,0), 20 µl de solução de lisozima (25 mg/ml) e 10 µl de solução de proteinase K (20 mg/ml). O tubo foi agitado em vórtex por 5 minutos, em alta velocidade, e colocado em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, e então, 55 °C por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 12000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubo limpo com capacidade de 1,5 ml e 400 µl de solução de PVPP (100 mg PVPP/ml PPB pH 7,2) foram adicionados, sendo a mistura agitada em vórtex em alta velocidade por 2 minutos. Foram adicionados ao tubo 2 µl de CaCl₂ 3 M e novamente agitados em vórtex por 2 minutos e centrifugado como já descrito acima. O sobrenadante, então, foi transferido

cuidadosamente para outro tubo limpo de microcentrífuga. Foram adicionados 30 µl de SDS 20% (p/v), e o tubo foi invertido várias vezes para misturar o reagente e colocado em banho-maria a 80 °C, por 10 minutos. Após retirar do banho-maria, foram adicionados imediatamente, 400 µl de PVPP, e o tubo foi invertido vagarosamente e, após, foi colocado em gelo por 5 minutos. O tubo foi centrifugado a 16000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubo de microcentrífuga limpo com capacidade de 1,5 ml. Foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol 100%, o tubo foi invertido várias vezes e deixado no freezer (aproximadamente - 20 °C), durante 12 horas (de um dia para o outro). Após esse período, o tubo foi centrifugado a 16000 x g, por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado sendo, o precipitado restante, lavado em 500 µl de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 16000 g e seco ao ar por 5 min. O precipitado foi, então, ressuspensão com 100 µl de TE e armazenado a - 20 °C. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 9.

4.3.9. Técnica PRO

Foi colocada em microtubo de 1,5 ml a amostra de solo de 0,25 g, e foram adicionados 500 µl de tampão fosfato de sódio 0,12 M pH 8,0 com 1% PVPP. O tubo sofreu agitação a 200 rpm por 10 minutos e logo após, foi centrifugado a 2940 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 200 µl de tampão 50/50, 10 µl de lisozima (25 mg/ml) e 5 µl de proteinase K (20 mg/ml). A mistura foi agitada em vórtex por 5 minutos e, após, incubada a 37 °C por 10 minutos. Finalizado esse período, a amostra sofreu três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196 °C) e descongelamento a 65 °C. Adicionou-se 15 µl de solução de SDS 20% e incubou-se o microtubo a 80 °C por 10 minutos para a finalização da lise celular. A amostra foi centrifugada, o sobrenadante recolhido e a ele foram adicionados 200 µl de PVPP/tampão fosfato de sódio (0,1 g/ml), sendo agitado em vórtex por 2 minutos. A seguir, 5 µl de solução de CaCl₂ 3 M foram adicionados, com agitação em vórtex por 2 minutos. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 16000 x g e o sobrenadante recebeu 0,6 volumes de isopropanol. A amostra foi deixada no *freezer* de um dia para o outro (aproximadamente 12

horas) e, após, sofreu centrifugação de 16000 x g por 5 minutos. O precipitado formado foi lavado com etanol 70%, ressuspenso com 100 µl de tampão TE e estocado em freezer a -20°C. Essa técnica se encontra esquematizada na Figura 10.

4.3.10. Extração de DNA do solo através do uso de kit comercial

Foi realizada a extração do DNA diretamente do solo utilizando o kit comercial *Power Soil DNA Isolation Kit* da MoBio, de acordo com a técnica sugerida pelo fabricante, utilizando-se 0,25 g de solo. O método utiliza pérolas de vidro e agitação (*bead beating*) para a lise das células, e finaliza com a purificação da amostra com filtro de resina (*spin column*).

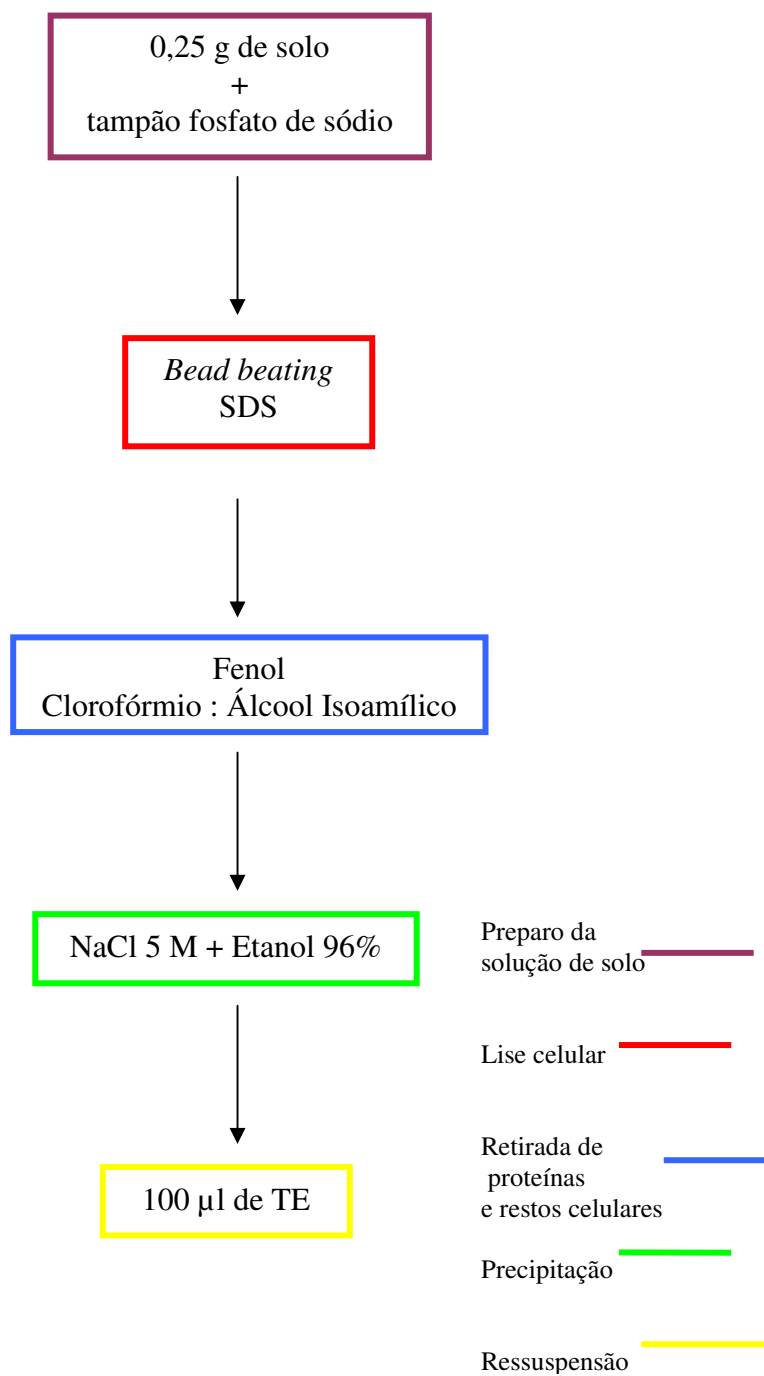


Figura 2. Fluxograma geral da técnica SMA.

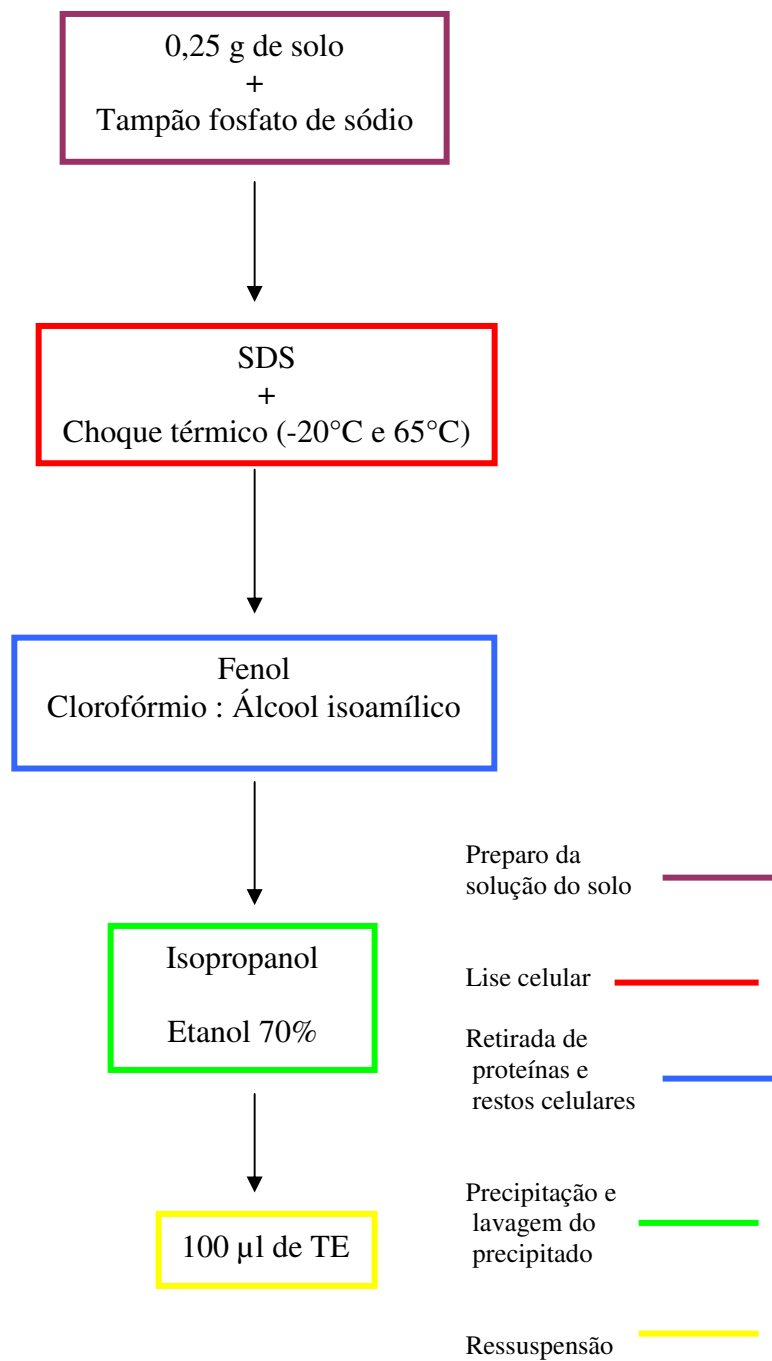


Figura 3. Fluxograma geral da técnica VIE.

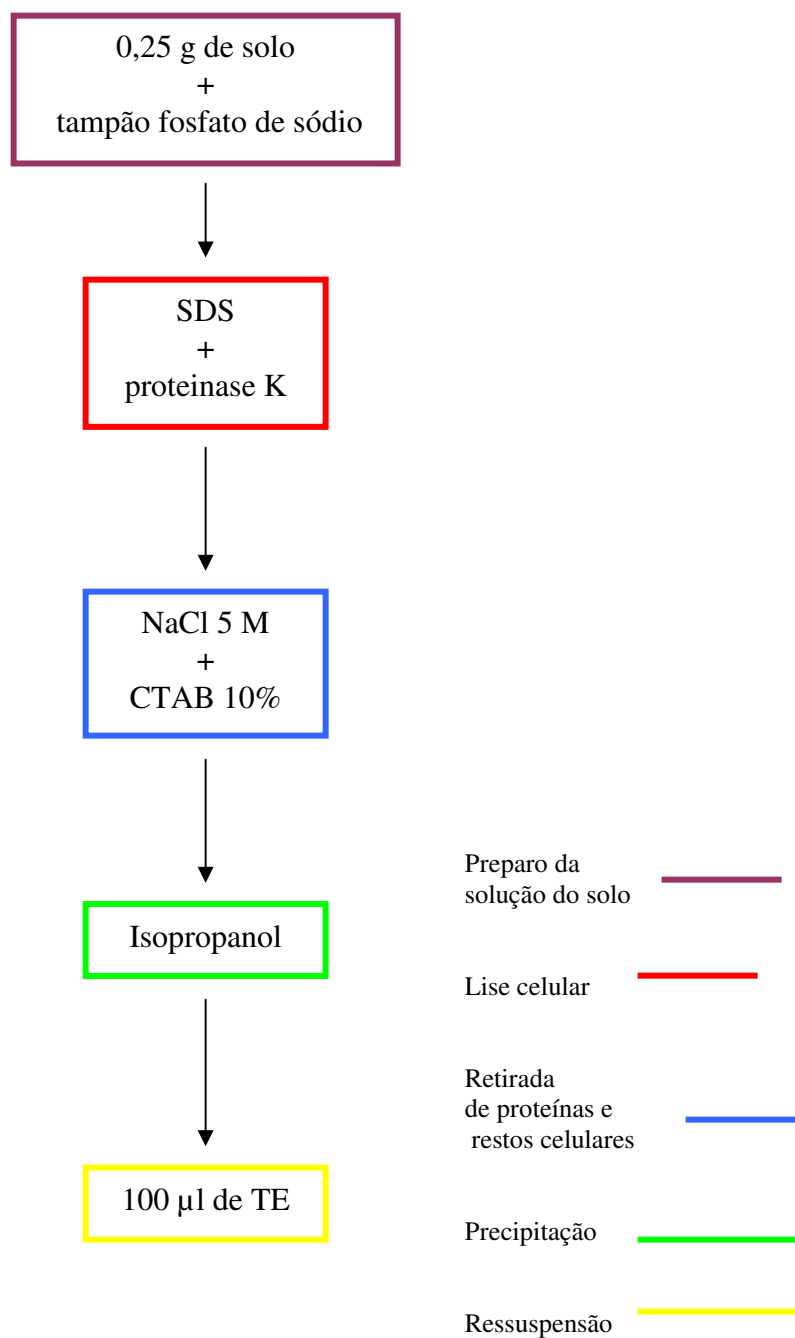


Figura 4. Fluxograma geral da técnica SAA.

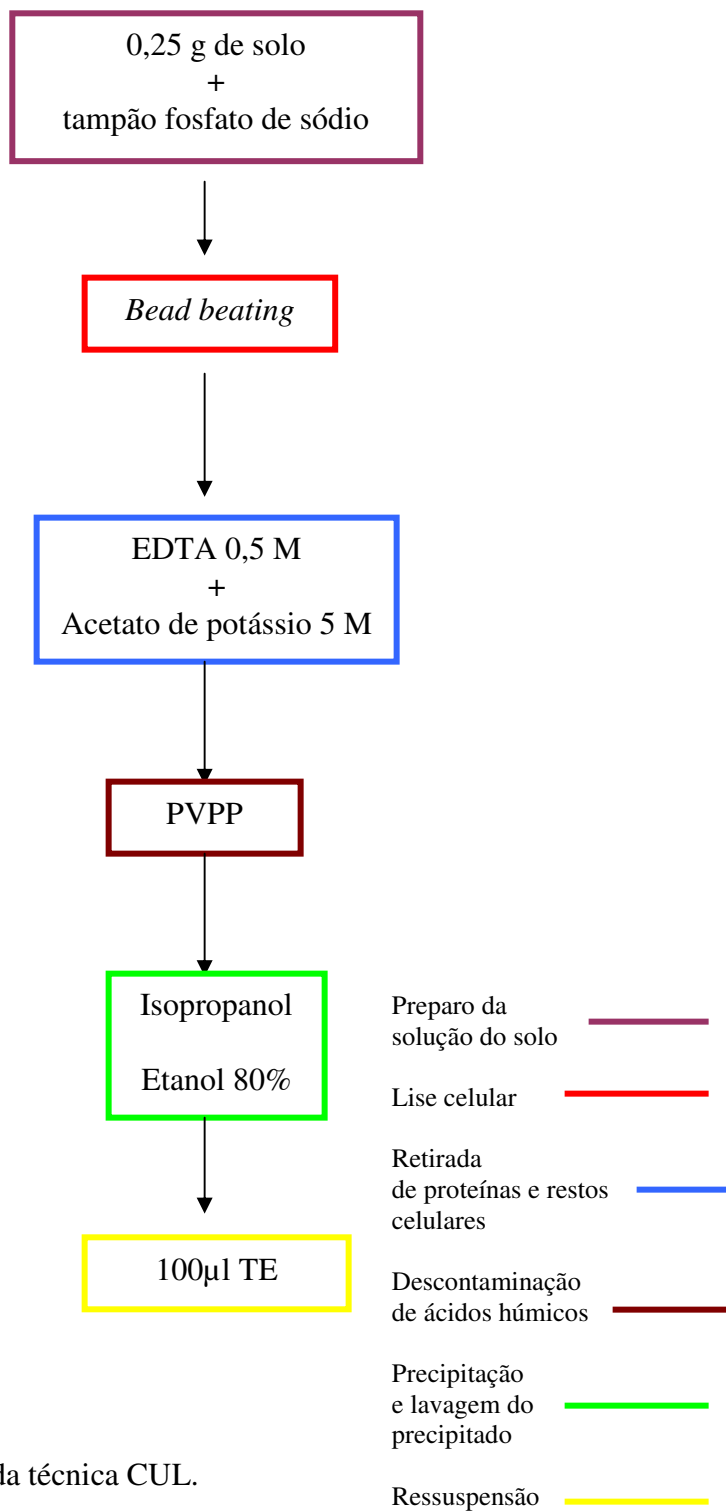


Figura 5. Fluxograma geral da técnica CUL.

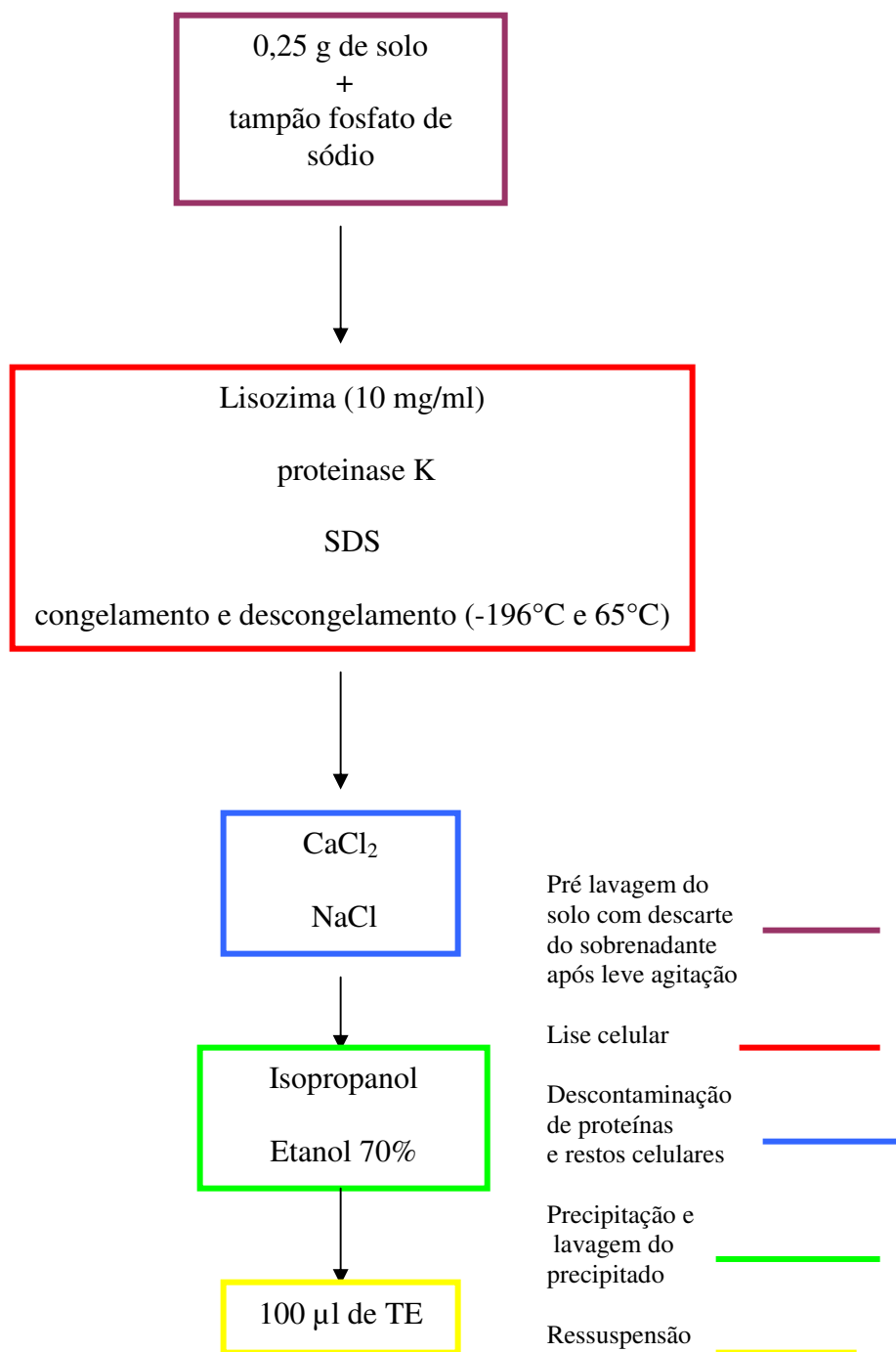


Figura 6. Fluxograma geral da técnica SEL.

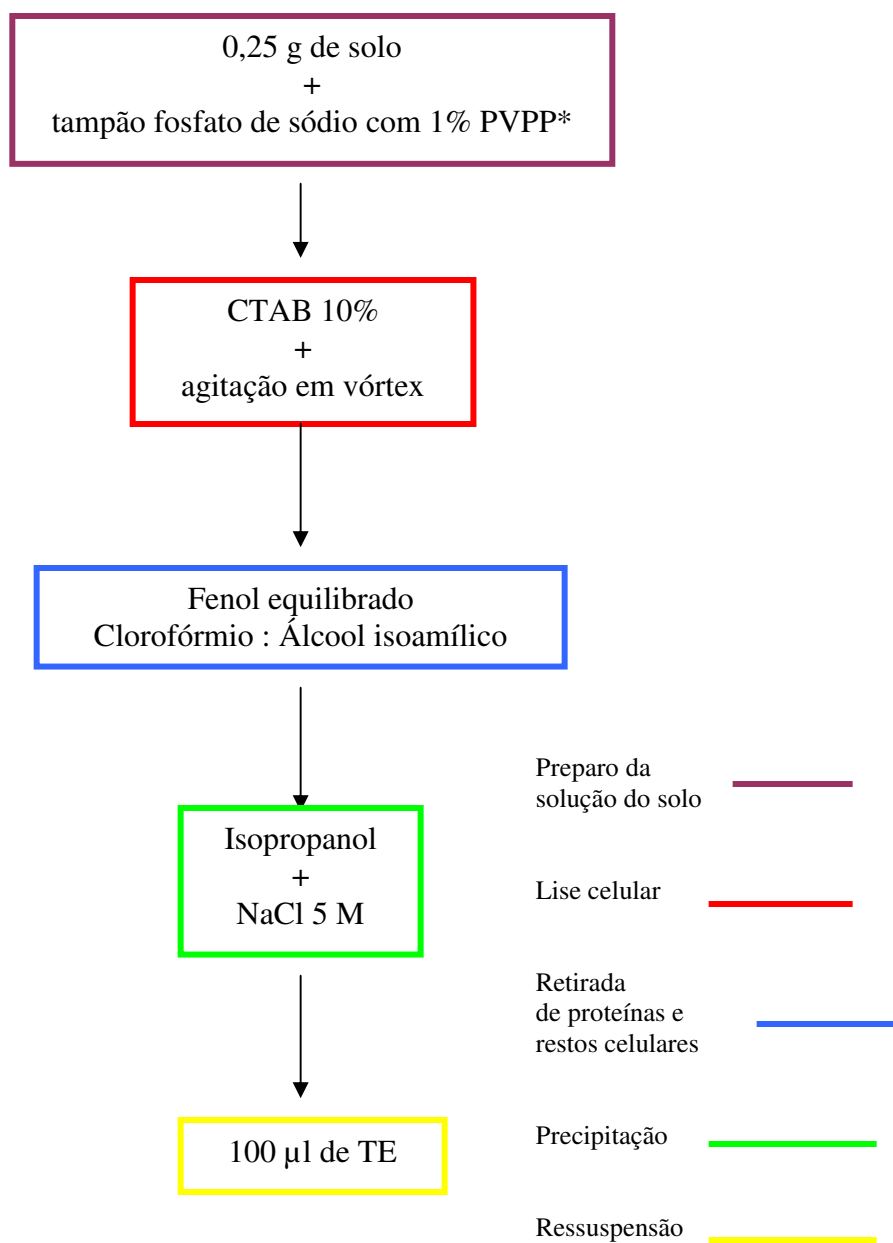


Figura 7. Fluxograma geral da técnica TSA.

(* usado para retirada de substâncias húmicas)

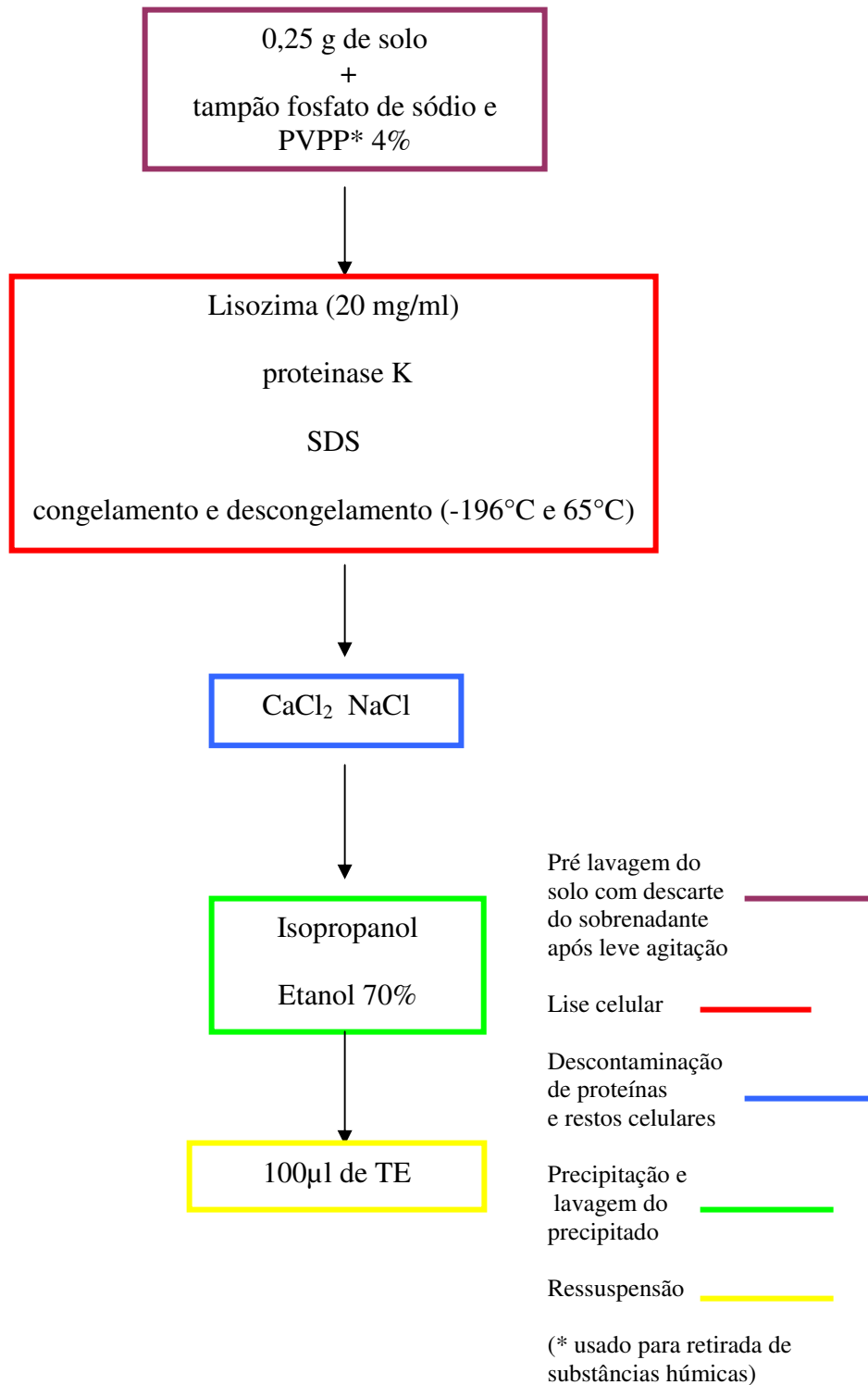


Figura 8. Fluxograma geral da técnica DIR.

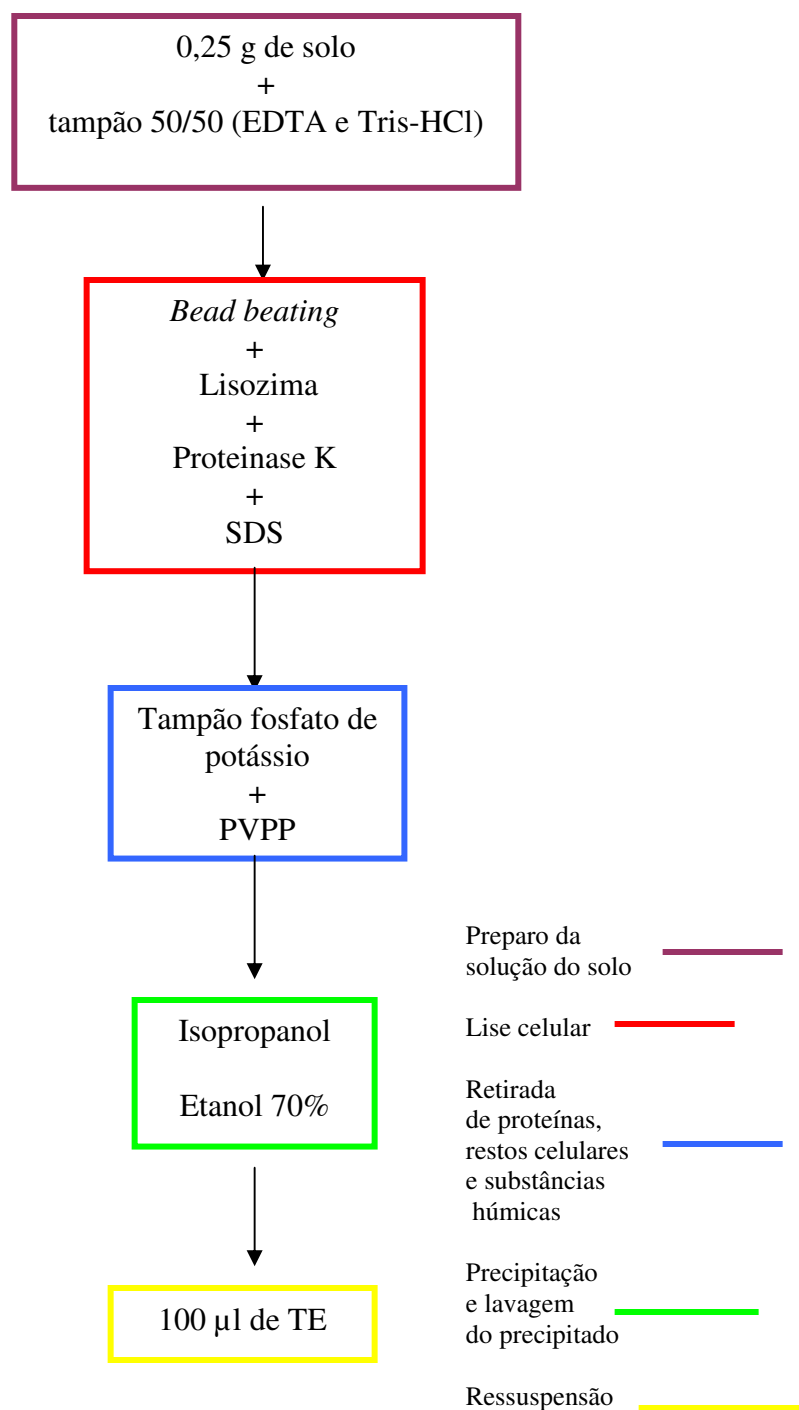


Figura 9. Fluxograma geral da técnica WEC.

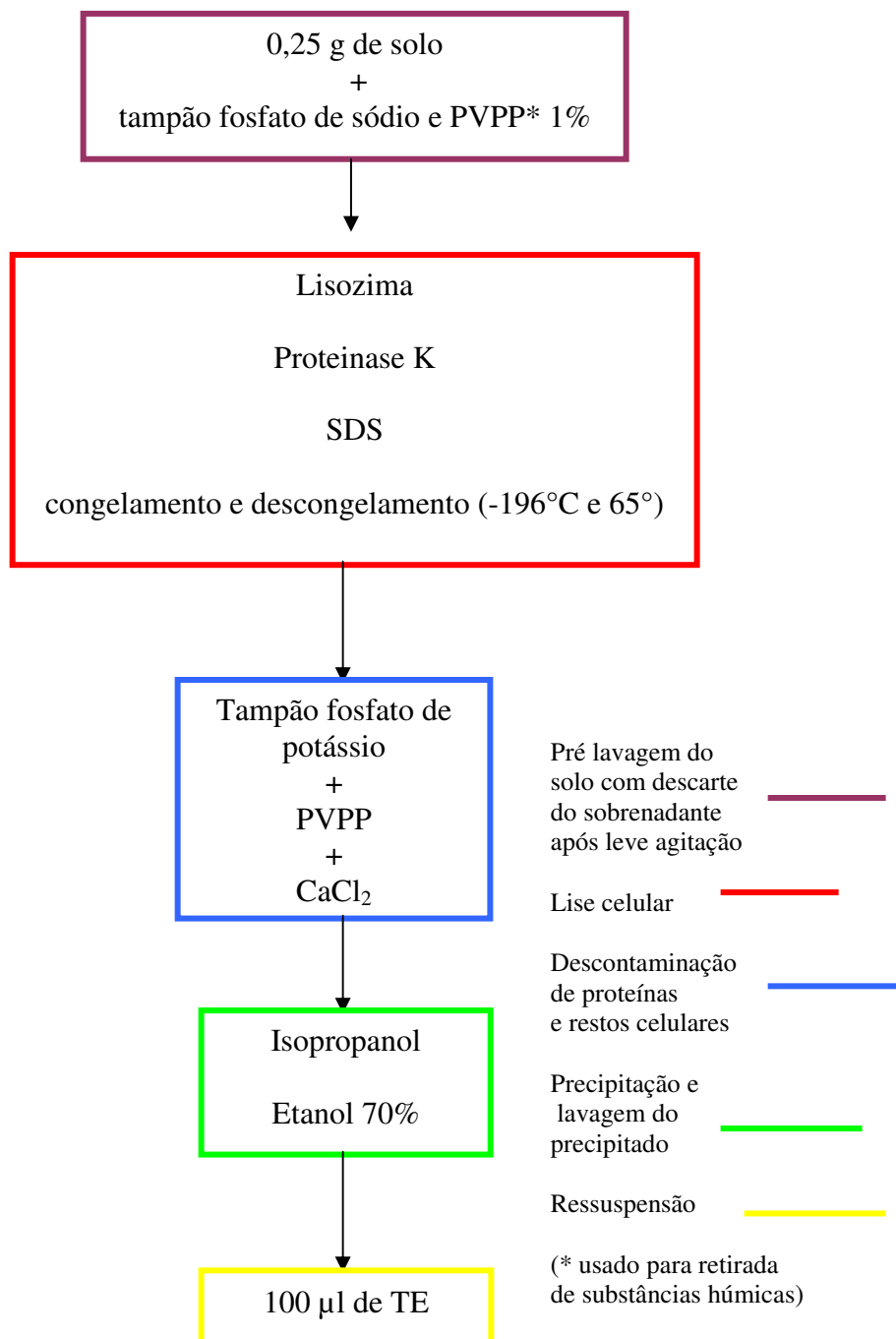


Figura 10. Fluxograma geral da técnica PRO.

4.4. Purificação da solução de DNA

Para a purificação, foi utilizado o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, da Amersham Biosciences – GE Healthcare, para a retirada de contaminantes como ácidos húmicos e restos celulares (proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos) que podem prejudicar a amplificação do DNA genômico através de PCR.

4.5. Análise das soluções de DNA

A solução de DNA extraída de cada técnica foi analisada quanto à eficiência de extração e qualidade do material obtido. Foram realizadas quatro análises: 1) eletroforese em gel de agarose; 2) leitura da absorbância a 260nm (A_{260}), para a quantificação do DNA, relação A_{260}/A_{280} (contaminação com proteínas) e relação A_{260}/A_{230} (contaminação com ácidos húmicos); 3) avaliação da coloração das soluções de DNA; e 4) amplificação do DNA extraído através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.5.1. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada com gel de agarose 0,8%, em cuba BioRad, a 120 V e 90 mA por 2 horas (aproximadamente 3.5 volts/cm), sendo o gel a seguir, corado em solução de brometo de etídeo 50 mg/ml por 30 minutos. As bandas foram observadas em trans-iluminador com iluminação ultravioleta e fotografadas com câmera digital marca Sony Cyber-Shot (5.1 megapixels). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 kb, marca Invitrogen.

4.5.2. Espectrofotometria

A leitura das absorbâncias das soluções de DNA foi realizada em espectrofotômetro *GeneQuant* (Pharmacia) para a quantificação do DNA em solução,

através da leitura da absorbância a 260nm. Para a quantificação de DNA de fita dupla utilizou-se a relação 1 unidade de $A_{260} = 50\mu\text{g dsDNA/ml}$ (CULLEN e HIRSCH, 1998).

A pureza da amostra foi analisada através das relações (A_{260}/A_{230}), para avaliar a pureza em relação aos ácidos húmicos e (A_{260}/A_{280}), para avaliar a pureza em relação às proteínas. Quanto maiores os valores das relações A_{260}/A_{230} ($>1,7$) e A_{260}/A_{280} ($>2,0$) mais puro o DNA e menor é a contaminação da solução por ácidos húmicos e proteínas, respectivamente (CULLEN e HIRSCH, 1998).

4.5.3. Coloração da solução de DNA

Os microtubos com a solução de DNA extraído do solo foram fotografados para a comparação da coloração das amostras, uma vez que a coloração pode indicar a presença de contaminantes.

4.5.4. PCR

O DNA extraído através das diferentes técnicas testadas foi submetido à reação de amplificação que flanqueia a região conservada 16S rDNA. Os *primers* utilizados foram BA338Fgc e UN518r (OVREAS et al., 1997), segundo Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados para a amplificação do DNA extraído do solo por PCR.

Iniciador	Seqüência (região 16S rDNA)	Fragmento amplificado
BA338Fgc	5'- GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGG GGCACGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG -3'	200 bp
UN518r	5'- ATTACCGCGGCTGCTGG - 3'	

A reação foi realizada com a seguinte constituição de reagentes: 5 μl de tampão de reação de PCR 10 X, 3 μl de MgCl_2 50 mM, 4 μl de cada dNTP 2,5 mM, 0,5 pmol de cada *primer*, 1 unidade de Taq polimerase, 1 μl de solução de DNA *template* (DNA extraído do

solo) e o volume completado para 50 µl com água milliQ estéril. A programação da reação foi de 95 °C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos de 92 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, finalizado com 72 °C por 10 minutos.

O produto de PCR (5µl) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% a 120 V e 90 mA, por 2 horas (aproximadamente 3,5 volts/cm), em cuba da BioRad. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo 50 mg/ml e as bandas foram observadas em trans-iluminador com iluminação ultravioleta e fotografadas com câmera digital marca Sony Cyber Shot (5.1 megapixels). Foi utilizado o marcador molecular de 100 bp, marca Invitrogen.

4.6. Extração de DNA de *Pseudomonas fluorescens*

Para a realização do controle positivo da reação de PCR supracitada, foi utilizado DNA genômico extraído do isolado de *Pseudomonas fluorescens* (B35), pertencente ao LAMAM (Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular), UFSCar, *campus* de Araras/SP. A extração de DNA foi realizada de acordo com técnica a seguir.

Centrifugou-se a 10000 x g durante 2 minutos, 1,5 ml da cultura com crescimento saturado (aproximadamente 4 horas), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 567 µl de TE através de repetidas pipetagens. Adicionou-se 30 µl de SDS 10% (para concentração final de 0,5%) e 5 µl de proteinase K (20 mg/ml, para concentração final de 100 µg/ml). Misturou-se bem e incubou-se o microtubo a 37 °C durante 1 hora. Após o período, foram adicionados 100 µl de NaCl 5 M, misturando-se bem. Foram adicionados, a seguir, 80 µl de CTAB 10% agitando-se bem e incubando a 65°C por 10 minutos. Após esse período, a temperatura foi diminuída até 25 °C e adicionou-se 750 µl de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). O microtubo foi invertido várias vezes para melhor mistura de todos os reagentes, sendo, a seguir, centrifugado a 10000 x g por 5 minutos. A fase superior foi removida e colocada em outro microtubo, adicionando-se 1 volume de solução de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25 : 24 : 1). O microtubo foi invertido várias vezes até a mistura completa dos reagentes, e em seguida,

centrifugado a 10000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionou-se 0,6 volume de isopropanol. O microtubo foi invertido várias vezes e acondicionado a -20°C por 2 horas. Foi realizada a centrifugação a 12000 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado, e o precipitado contendo o DNA foi lavado com 600 µl de etanol 70%. Foi realizada novamente a centrifugação a 12000 x g por 5 minutos, sendo o sobrenadante retirado cuidadosamente, o precipitado lavado novamente com 300 µl de etanol absoluto, sendo então, centrifugado a 12000 x g por 5 minutos. O precipitado foi seco ao ar por 5 minutos, ressuspendido em 100 µl de TE, e armazenado a -20 °C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises das características dos solos testados

Os resultados da análise química, os valores de umidade e granulometria dos solos testados estão descritos nas Tabelas 2 e 3. Podem ser observadas algumas diferenças entre os solos sob manejo orgânico e convencional, especialmente quanto ao pH e concentração de alumínio. Embora os dois solos possam ser considerados ácidos, sob manejo orgânico o valor de pH é menor.

Tabela 2. Características químicas dos solos testados.

<i>Solo</i>	<i>P resina</i> <i>mg . dm⁻³</i>	<i>pH</i> <i>CaCl₂</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>H+Al</i>	<i>Al</i>	<i>SB</i>	<i>CTC</i>	<i>V</i> <i>%</i>
			<i>mmolc . dm⁻³</i>							
O	6,0	3,8	1,0	2,0	1,0	22,0	10,0	4,0	26,0	15
C	5,0	4,5	2,1	10,0	2,0	16,0	2,0	14,1	30,1	47

Legenda: solo sob manejo orgânico (**O**); solo sob manejo convencional (**C**); **P resina** – análise na qual o P é retirado do solo através do uso de resina de troca de íons; **H+Al** – acidez potencial; **SB** – soma de bases (soma dos teores de K + Ca + Mg); **CTC** – capacidade de troca catiônica; **V%** - saturação por bases; **mmolc/dm³** – milimol de carga por decímetro cúbico - tem sido utilizado em substituição ao miliequivalente (mesmo valor).

A concentração de alumínio no solo orgânico foi cinco vezes superior que no solo sob manejo convencional, devido ao fato deste ter recebido tratamentos de calagem (adição de calcário) para o aumento do pH e gessagem (adição de gesso) no intuito de diminuir os teores de alumínio, elemento tóxico para as raízes das plantas. Isto pode ser comprovado pelo teor de cálcio do solo sob manejo convencional, cinco vezes maior que no solo orgânico (Tabela 2).

A porcentagem de umidade dos solos estudados apresentou valores muito próximos (6 e 8 %) para os solos sob manejo orgânico e convencional, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Umidade e granulometria dos solos testados.

<i>Solo</i>	<i>% Umidade</i>	<i>% areia</i>	<i>% silte</i>	<i>% argila</i>
O	6,13	78	4	18
C	8,63	74	4	22

solo sob manejo orgânico (O), solo sob manejo convencional (C).

Quanto à análise granulométrica, não foram observadas diferenças entre os solos, uma vez que estes foram coletados de áreas próximas e constituem mesmo tipo de solo, isto é, ambos são classificados como latossolo vermelho eutrófico. Como já esperado, o solo sob cultivo orgânico apresentou valores superiores de matéria orgânica e carbono orgânico graças à adição de insumos orgânicos ao solo (Tabela 4).

Tabela 4. Matéria orgânica, carbono orgânico e biomassa microbiana dos solos testados.

<i>Solo</i>	<i>Matéria orgânica</i> (<i>g . dm⁻³</i>)	<i>Carbono orgânico</i> (<i>µg . g⁻¹</i>)	<i>Biomassa microbiana de C</i> (<i>µg . g⁻¹</i>)
O	9	821,04	666,94
C	7	369,92	295,36

solo sob manejo orgânico (O), solo sob manejo convencional (C).

Este fato, por consequência, resultou no valor maior de biomassa microbiana, pois a matéria orgânica serve de substrato para o desenvolvimento dos microrganismos no solo. O manejo diferenciado realizado no tratamento orgânico traz, por resultado, o aumento dos microrganismos no solo, porém, não se sabe se o aumento no número de microrganismos está ocorrendo junto com o aumento na diversidade de espécies e gêneros, e se esse aumento da diversidade traz benefícios para a rizosfera e o desenvolvimento da planta. Para responder essas questões, a biologia molecular apresenta ferramentas eficazes na análise microbiana do solo, de forma a avaliar a diversidade através da análise direta do DNA. A principal etapa necessária para esse tipo de estudo é a extração do DNA diretamente do solo, principal objeto deste estudo.

5.2. Comparação da eficiência das técnicas de extração de DNA dos solos testados

Para a comparação das técnicas testadas foi realizada uma análise do método como um todo, uma vez que cada técnica é um conjunto de etapas e estas não podem ser analisadas isoladamente, e juntas apresentam resultados distintos (Santos, 2002).

Entre as principais análises necessárias para a avaliação da eficiência de extração e qualidade do material, estão a avaliação da pureza das amostras através de leitura em espectrofotômetro das relações A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} (para mensuração de ácidos húmicos e proteínas, respectivamente) e quantificação do DNA extraído, também por espectrofotometria através da leitura de absorvância A_{260} .

Nas tabelas 5 e 6 observam-se os valores das relações de pureza do DNA. Para as duas relações, A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} , os valores obtidos foram baixos para todos os protocolos e nos dois tipos de solos estudados, não ultrapassando o valor de 1,3. Os valores de A_{260}/A_{230} aumentaram com a purificação da solução, o que indica menor concentração de ácidos húmicos na amostra. Para os valores de A_{260}/A_{280} , porém, houve uma diminuição, significando que o processo de purificação realizado não foi eficiente para a eliminação de proteínas presentes na solução. Este resultado deve-se provavelmente, à grande concentração de ácidos húmicos na solução que não foram eliminados durante a etapa de

purificação, e podem ter causado problemas na leitura da absorbância por espectrofotometria, análise de grande sensibilidade.

Tabela 5. Medidas de pureza (relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}), das amostras de DNA sem purificação extraídos de solo orgânico (O) e convencional (C), utilizando-se diferentes técnicas de extração de DNA¹.

<i>Técnicas</i>	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
SMA O	1,264	0,521
SMA C	1,169	0,769
VIE O	1,247	0,597
VIE C	1,155	0,977
TSA O	1,130	1,000
TSA C	1,061	1,000
SAA O	1,364	0,341
SAA C	1,333	0,684
SEL O	1,417	0,301
SEL C	1,227	0,560
DIR O	1,483	0,238
DIR C	1,261	0,399
WEC O	1,244	0,452
WEC C	1,252	0,516
PRO O	1,135	0,275
PRO C	1,181	0,384
CUL O	1,282	0,219
CUL C	1,318	0,220

¹As siglas referem-se às técnicas testadas, conforme descrição em Material e Métodos.

Tabela 6. Medidas de pureza (relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}), das amostras de DNA sem purificação extraídos de solo orgânico (O) e convencional (C), utilizando-se diferentes técnicas de extração de DNA¹.

<i>Técnicas</i>	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
SEL O	1,010	0,992
SEL C	1,040	1,050
DIR O	0,983	1,033
DIR C	1,000	1,011
PRO O	1,009	1,050
PRO C	1,036	1,031
KIT O	1,044	1,010
KIT C	1,073	1,009

¹As siglas referem-se às técnicas testadas, conforme descrição em Material e Métodos.

A Tabela 7 apresenta os resultados da quantificação de DNA por espectrofotometria. Pode-se observar que as técnicas VIE e SMA apresentaram maiores valores de concentração de DNA e a técnica DIR com e sem purificação, os menores.

Um ponto controverso neste dado é o aumento no valor da concentração de DNA após a purificação para a técnica DIR, diferentemente do que ocorreu para as técnicas SEL e PRO. Sabe-se (ZHOU et al., 1996; SANTOS, 2002) que a etapa de purificação causa perda de DNA, devido ao processo de filtragem, por isso o resultado aqui obtido é inesperado.

Tabela 7. Quantificação do DNA por espectrofotometria, extraída de solo sob manejo orgânico (O) e convencional (C).

Técnicas ¹	Concentração de DNA ($\mu\text{g/g}$ de solo seco)
SMA O	52,6
SMA C	94,0
VIE O	76,0
VIE C	105,6
TSA O	50,8
TSA C	64,7
SAA O	25,0
SAA C	67,6
SEL O	23,4
SEL C	48,2
DIR O	3,4
DIR C	6,2
WEC O	20,8
WEC C	26,8
PRO O	43,4
PRO C	44,0
CUL O	26,4
CUL C	18,7
SEL O - purificado	12,2
SEL C - purificado	19,0
DIR O - purificado	12,5
DIR C - purificado	11,6
PRO O - purificado	15,9
PRO C - purificado	17,08
KIT O	55,8
KIT C	64,9

¹As siglas referem-se às técnicas testadas, conforme descrição em Material e Métodos.

De acordo com He (2004) os ácidos húmicos em solução absorvem mais na faixa de A_{230} , mas também são lidos a A_{260} e A_{280} , o que interfere de forma significativa na quantificação e nas medidas de pureza de soluções de DNA extraído diretamente do solo (Figura 11).

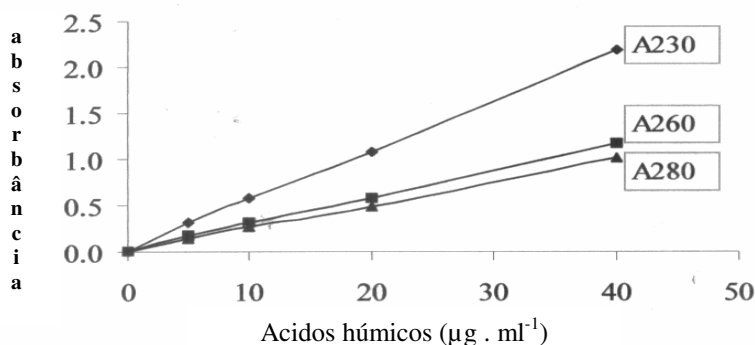


Figura 11. Medidas de absorbância para quantificação de substâncias húmicas (HE, 2004).

A quantificação de DNA é um tema bastante estudado e discutido devido ao fato das metodologias atualmente conhecidas ainda não apresentarem alta eficiência e confiabilidade nos resultados. De acordo com De Mey et al. (2006), o uso da espectrofotometria para mensuração de DNA em solução apresenta-se como uma boa alternativa, porém apenas para soluções com alta pureza.

Ainda de acordo com os autores acima, o uso de corantes e leitura por fluorometria também se mostra como uma alternativa para a quantificação de DNA em solução, porém também apresentam erros, principalmente quando o conteúdo de G+C da amostra é pequeno, proporcionando grande variabilidade, o que indica ser um método com pouca confiabilidade.

Outro método de avaliação da eficiência da extração do DNA dos solos pelas técnicas testadas foi através da eletroforese em gel de agarose, isto é, em análise comparativa, a intensidade da banda de DNA no gel indica o rendimento na extração do DNA do solo, além da integridade (banda única) e da pureza (sem arraste da solução).

Os resultados de concentração de DNA obtidos por espectrofotometria não coincidem com aqueles da eletroforese, na qual podem ser observadas bandas maiores e

mais intensas nas técnicas SEL, DIR, PRO e KIT e bandas mais fracas nas técnicas SMA, VIE e WEC, sendo que para as técnicas CUL, TSA e SAA não foi possível observar nenhuma banda (Figuras 12 e 13).

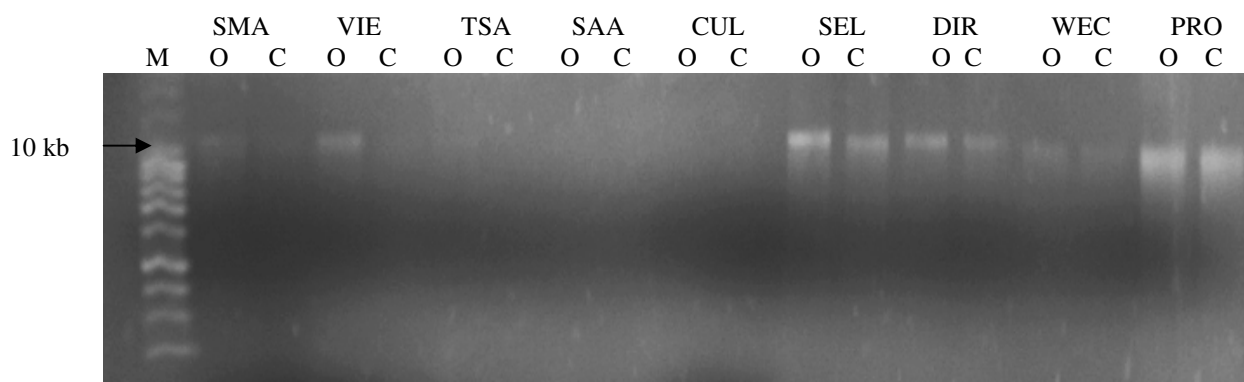


Figura 12. Gel de eletroforese (agarose 0,8%) realizado com DNA bruto extraído dos solos sob manejo orgânico (O) e convencional (C) testados, utilizando-se diferentes técnicas de extração de DNA, cujas siglas estão descritas em Materiais e Métodos. M refere-se ao marcador de peso molecular de 1 kb.

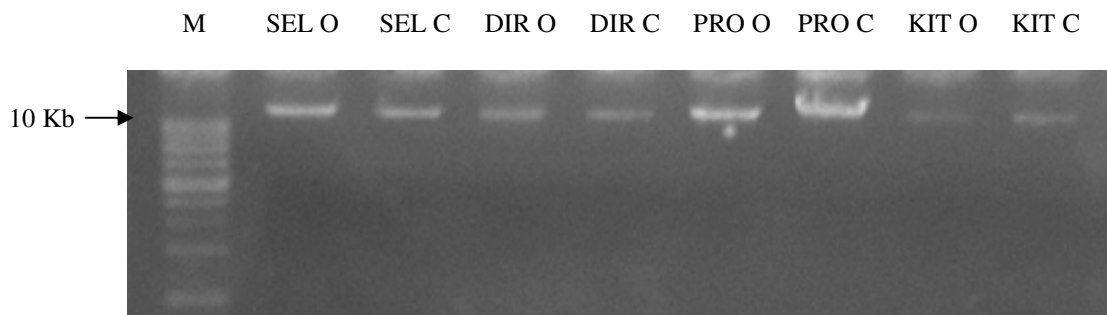


Figura 13. Gel de eletroforese (agarose 0,8%) realizado com DNA purificado extraído dos solos sob manejo orgânico (O) e convencional (C) testados, utilizando-se diferentes técnicas de extração de DNA, cujas siglas estão descritas em Materiais e Métodos. M refere-se ao marcador de peso molecular de 1 kb.

Devido aos problemas já comentados de que os ácidos húmicos podem também absorver luz na faixa de A_{260} (HE, 2004) acredita-se que para a quantificação do DNA extraído do solo e para a análise de sua pureza, o melhor método seja através da eletroforese em gel de agarose. Por todos esses motivos, esta foi a metodologia utilizada para a comparação entre as técnicas estudadas.

De acordo com as bandas observadas na eletroforese em gel de agarose, o solo sob manejo orgânico apresentou bandas de DNA mais intensas do que o solo sob manejo convencional em todas as técnicas utilizadas em que foi possível observar bandas.

Este resultado está relacionado com o fato de que o solo orgânico, devido ao seu manejo caracterizado pela grande adição de matéria orgânica, comprovada pela análise do solo (Tabela 4), favorece o aumento da microbiota apresentando uma grande biomassa, como já discutido anteriormente, refletindo-se assim na extração de DNA dos microrganismos presentes no solo (Figura 14).

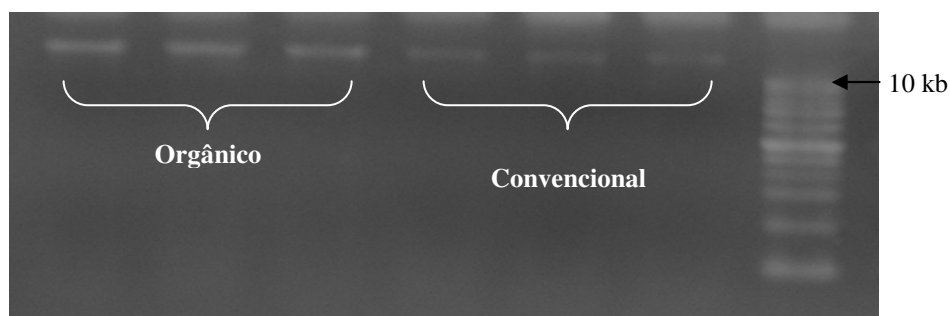


Figura 14. Gel de eletroforese (agarose 0,8%) realizado com DNA extraído dos solos sob manejo orgânico e convencional testados, utilizando-se a técnica de extração de DNA de Selbach. M refere-se ao marcador de peso molecular de 1 kb.

É fato que além do tipo do solo, a quantidade de biomassa microbiana contida no solo determina o rendimento do DNA extraído. Zhou et al. (1996) encontraram correlação significativa entre o rendimento de extração de DNA do solo e o teor de carbono orgânico encontrado nas amostras de solo. Resultados semelhantes foram citados por Blagodatskaya et al. (2003), onde a quantidade de DNA extraído decresceu proporcionalmente ao decréscimo de biomassa microbiana das amostras de solo analisadas. Eles concluíram que em solos do mesmo tipo, com propriedades físico-químicas similares, a quantidade de DNA extraído reflete a biomassa microbiana aí presente.

Apesar da diferença entre os solos, foram encontrados resultados diferentes de rendimento de acordo com as diferentes técnicas aplicadas. Viestel (1995) desenvolveu a técnica VIE e obteve ótimos resultados para a extração de DNA de solo tipo latossolo vermelho amarelo e solo arenoso provenientes do estado do Rio de Janeiro. Esta técnica,

porém, não apresentou resultado favorável para os solos estudados neste trabalho, como foi observado na Figura 12.

A técnica de SEL apresentou bandas fortes nos dois tipos de solo. Outro ponto importante nessa metodologia foi que as bandas apresentaram pouco arraste, indicando que esse DNA não possui altos teores de contaminantes na solução. A presença de arraste na banda caracteriza o alto teor de contaminantes co-extraídos do solo no processo de extração. Porém, na técnica PRO foram observadas bandas de forte intensidade e arraste, indicando a necessidade de um processo de purificação para a análise do DNA por PCR.

Utilizando-se a técnica DIR, observaram-se bandas de DNA no gel, mas de inferior intensidade quando comparadas com aquelas obtidas com a técnica SEL. Este resultado chama a atenção, pois a técnica DIR é semelhante à técnica SEL, diferindo apenas na inclusão de uma etapa de agitação e do aumento da concentração de lisozima adicionada, potencializando a lise das células microbianas. Este mesmo resultado foi obtido por Santos (2002) que testando as técnicas SEL e DIR para a extração de DNA de solos de Goiás e Bahia, obteve maior rendimento de extração com a técnica SEL, porém conseguindo um DNA mais puro com a técnica DIR.

Alguns pesquisadores observaram que o aumento da etapa de lise não necessariamente produz um aumento no rendimento de DNA extraído do solo (MOREÉ et al., 1994; CULLEN e HIRSCH, 1998; KRSEK e WELLINGTON, 1999). Esses autores justificaram esse resultado devido a uma possível degradação do DNA por nucleases liberadas durante as etapas de lise, ou a adsorção do DNA nas partículas de argila do solo.

Podemos notar na eletroforese com as amostras purificadas (Figura 13), que as bandas apresentaram-se menos intensas que no gel com as amostras sem purificação (Figura 12), uma vez que esta etapa causa perdas de DNA. Para a realização desta eletroforese foi necessário o uso de 25 µl da amostra para que fosse possível observar bandas nítidas no gel. Podemos observar, porém, que as bandas ainda são intensas e que os resultados são semelhantes às amostras antes da purificação, isto é, a técnica SEL apresenta bandas intensas e sem arraste, a técnica DIR apresenta bandas sem arraste, porém menos intensas que a técnica SEL. Para a técnica PRO, foram observadas as bandas mais intensas, porém ainda com algum arraste, indicando que a amostra continua com algum

contaminante, apesar da etapa de purificação. A banda apresentada pelo kit comercial mostrou-se a menos intensa entre as técnicas que sofreram purificação.

Com todas as técnicas foram obtidas bandas de DNA acima de 10 kb, e com nenhuma fragmentação (alta integridade), sendo isto favorável para a análise do material genético, principalmente em estudos que utilizam clonagem e sequenciamento, destacando aqueles que envolvem metagenoma, isto é, análise biotecnológica de material genético microbiano do ambiente (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003; STREIT e SCHMITZ, 2004; DANIEL, 2005).

5.3. Coloração das soluções de DNA

Comparando-se as soluções de DNA extraído para cada técnica (Figuras 16 a 19), foi possível observar que a maioria apresentou coloração marrom e precipitação, provavelmente restos celulares e acúmulo de reagentes do processo de extração. Este fato mostra que a solução de DNA está contaminada e que houve a co-extração de substâncias húmicas, sendo, portanto, necessária a realização de etapas de purificação para a análise do DNA em solução, como já observado por outros autores (TEBBE e VAHJEN, 1993; LÉVESQUE et al., 1997; CULLEN e HIRSCH, 1998; MILLER et al., 1999; FROSTEGARD et al., 1999; BURGMANN et al., 2001).

As soluções de DNA extraído a partir das técnicas SAA e CUL apresentaram coloração clara (Figura 18), porém, observando o resultado da eletroforese, verificou-se que estas técnicas não apresentaram bandas, indicando que não houve extração de DNA dos solos estudados utilizando essas metodologias (Figura 12).

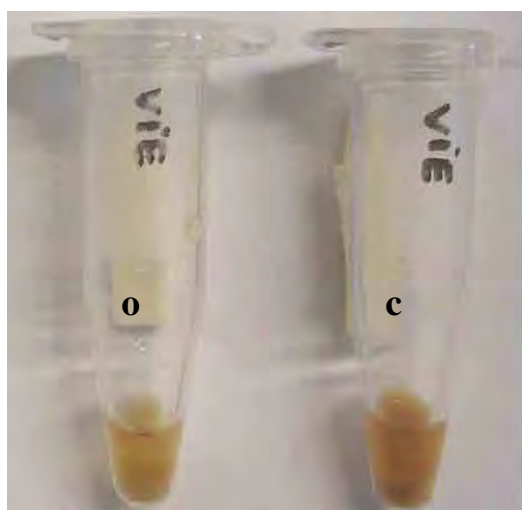
Já a solução de DNA da técnica SEL para solo orgânico apresentou coloração clara, coincidindo esse fato com a banda observada na eletroforese, que se mostrou forte e sem arraste (Figura 17). Para a técnica PRO, a solução mostrou-se escura e com alta contaminação, indicando que o arraste da banda na eletroforese foi consequência da co-extração de contaminantes que podem interferir nas análises do DNA extraído, necessitando, por isso, de uma etapa de purificação para esta técnica (Figura 18).

Soluções de DNA a partir das técnicas SEL, DIR e PRO, por apresentarem os melhores resultados de eficiência de extração de acordo com a eletroforese, foram submetidas à purificação utilizando um kit comercial *GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit* da GE Healthcare (Amersham Biosciences) que utiliza filtros com resina (*spin column*), para o processo de purificação (Figura 15). Pode-se observar que, após a purificação, as soluções de DNA apresentaram-se transparentes e límpidas, o que pode mostrar a ausência de substâncias contaminantes como ácidos húmicos, responsáveis pela coloração marrom das soluções antes da purificação (Figuras 17 e 18).

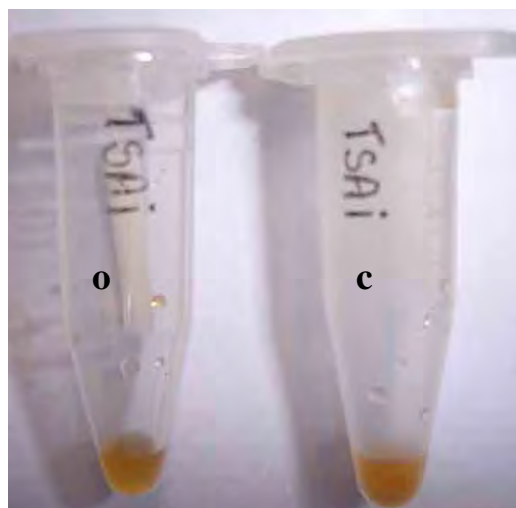


Figura 15. Fotografia do *spin column*, utilizado para a purificação da solução de DNA.

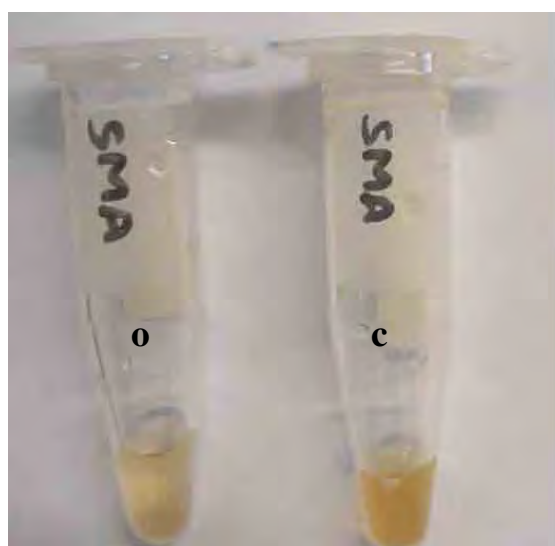
Burgmann et al. (2001), desenvolvendo uma técnica para extração de DNA diretamente do solo, obtiveram êxito na extração do DNA puro e totalmente apto à amplificação direta por PCR, sem necessidade de etapas de purificação. Porém, quando a metodologia foi aplicada a solos com pH abaixo de 4,5 a solução de DNA obtida apresentou-se escura e sem resultado positivo para amplificação.



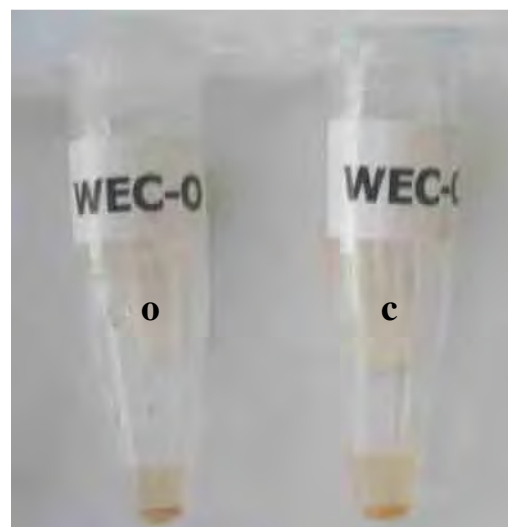
Técnica de Viestel (VIE)



Técnica de Tsai (TSA)

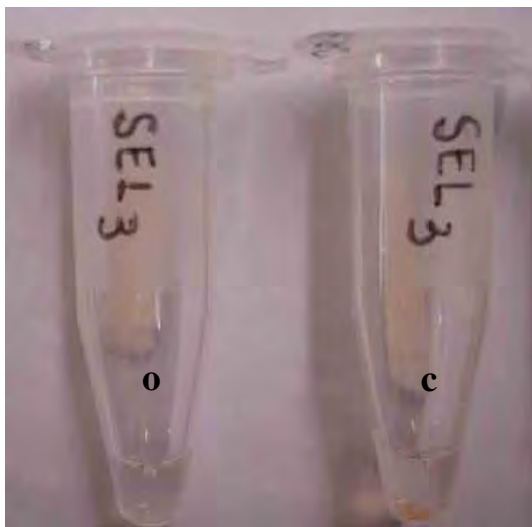


Técnica de Smalla (SMA)



Técnica de Wechter (WEC)

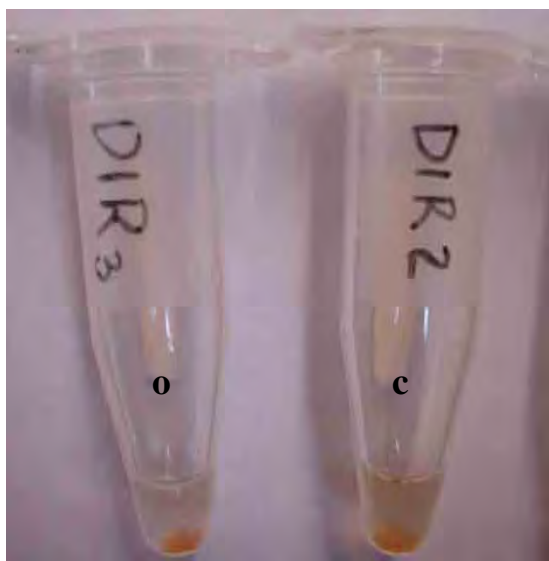
Figura 16. Microtubos com solução de DNA extraído do solo (o – solo orgânico, c – solo convencional).



Técnica de Selbach (SEL)
(DNA não purificado)



Técnica de Selbach (SEL)
(DNA purificado)

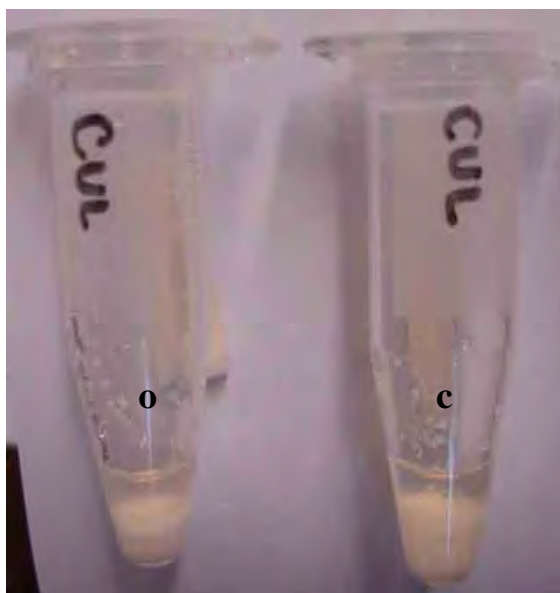


Técnica de Direito (DIR)
(DNA não purificado)

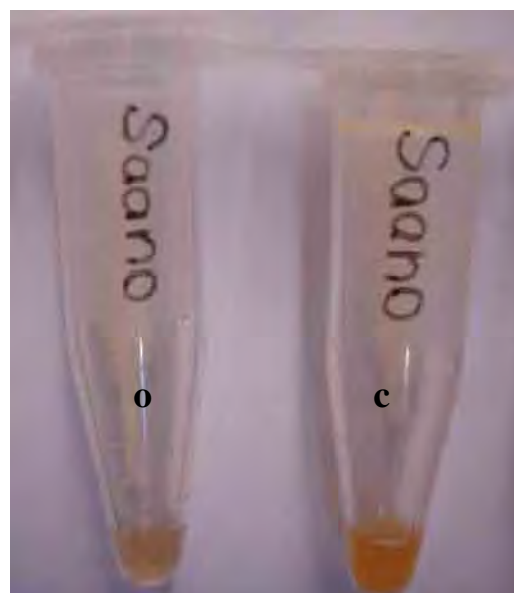


Técnica de Direito (DIR)
(DNA purificado)

Figura 17. Microtubos com solução de DNA extraído do solo (o – solo orgânico, c – solo convencional).



Técnica de Cullen (CUL)



Técnica de Saano (SAA)

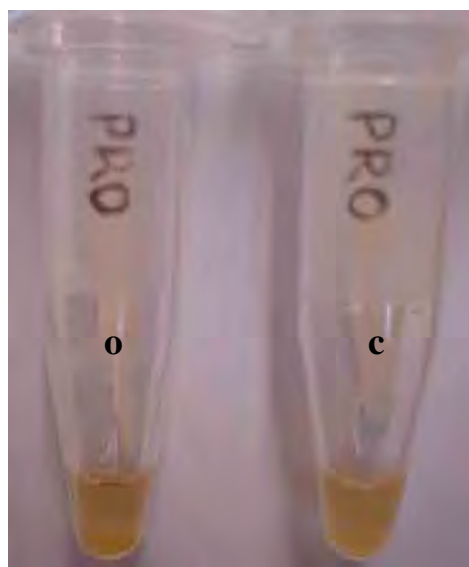
Técnica proposto (PRO)
(DNA não purificado)Técnica proposto (PRO)
(DNA purificado)

Figura 18. Microtubos com solução de DNA extraído do solo (o – solo orgânico, c – solo convencional).

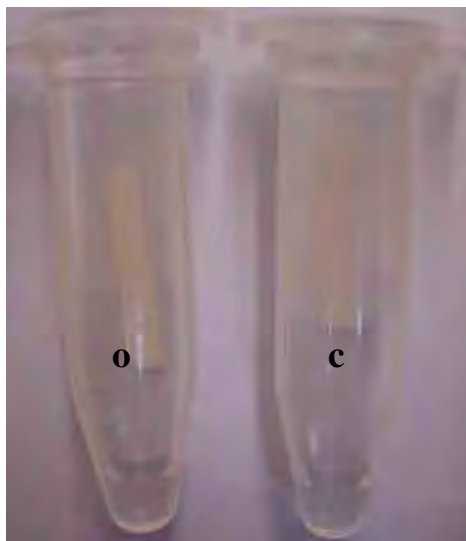


Figura 19. Microtubos com solução de DNA extraído do solo através de kit de extração comercial (KIT) (o – solo orgânico, c – solo convencional).

Esse resultado indicou que as características do solo, entre elas o pH, podem influenciar a eficiência da técnica e sua qualidade. Os solos brasileiros são, no geral, caracterizados por sua acidez, e este fato os diferencia dos solos de outras regiões, como Europa e América do Norte, onde estudos de técnicas são exaustivamente realizados. Os solos analisados neste estudo apresentam pH baixo, sendo, portanto, um obstáculo quanto à eficiência de extração de DNA, reforçando a necessidade de purificação das amostras.

5.4. PCR

A partir dos resultados sobre a eficiência de extração de DNA observados na eletroforese, as técnicas SEL, DIR, PRO e KIT foram selecionadas para serem testadas na amplificação de DNA por PCR.

Como se pode observar na figura 20, a técnica SEL para o solo sob manejo convencional resultou uma solução de DNA com grau de pureza tal que a reação de amplificação por PCR ocorreu com sucesso, mostrando assim ser esta uma técnica bastante eficiente para os solos estudados, especificamente do estado de São Paulo.



Figura 20. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados de PCR da região 16S rDNA (*primers* BA338Fgc e UN518r) a partir de amostras de DNA sem purificação. Legenda: - controle negativo, + controle positivo com *Pseudomonas fluorescens*; PRO O/ PRO C - técnica Proposta em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; SEL O/ SEL C – técnica de Selbach em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; DIR O/ DIR C – técnica de Direito em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; KIT O/ KIT C – kit comercial em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; M: marcador de peso molecular 100 bp.

Este mesmo resultado não foi observado por Santos (2002), que testou a mesma técnica para extração de DNA dos solos de Goiás e Bahia, e encontrou grande eficiência de extração com essa técnica, porém necessitou de uma etapa de purificação para o sucesso na reação de PCR.

A amostra de solução de DNA extraída a partir de KIT mostrou-se pura e apresentou sucesso na amplificação, porém a última etapa no processo de extração do kit consta de purificação da amostra recém extraída com o uso de filtros de resina (*spin column*), o que torna a amostra, aparentemente, pura, indicando a retirada de contaminantes que podem interferir no processo de amplificação por PCR.

Apesar do sucesso na reação de amplificação do material genômico extraído do solo convencional pela técnica SEL, o mesmo não ocorreu para o solo orgânico indicando assim que o manejo realizado no solo pode interferir na eficiência da extração de DNA pela mesma técnica.

É comum na literatura, trabalho que avaliam diferentes tipos de solo e a eficiência na extração de DNA do solo (ZHOU et al., 1996; YEATES et al., 1998; LLOYD-JONES e HUNTER, 2001). Não há, porém, estudos de um mesmo tipo de solo com distintos manejos, como solo com tratamento orgânico ou convencional. Esse resultado, no entanto, mostra que o mesmo tipo de solo, dependendo do seu tratamento (uso de diferentes insumos) pode apresentar resultados diversos na eficiência de extração em relação a concentração de DNA extraído. Miller et al. (1999) observaram que a complexidade do solo e seus múltiplos fatores podem afetar a *performance* do método de extração de DNA podendo obter, com a mesma técnica, resultados diferentes.

Apesar do resultado positivo apresentado pela técnica SEL para o solo convencional, as outras técnicas não apresentaram resultados satisfatórios. Isso indica a necessidade de purificação das amostras de DNA, pois é provável que a solução esteja contaminada com substâncias inibidoras da PCR.

Fotos dos microtubos com solução de DNA antes da purificação mostram uma solução com contaminantes de coloração escura, indicando a presença de substâncias húmicas (TEBBE e VAHJEN, 1993; CULLEN e HIRSCH, 1998; MILLER et al., 1999), principal contaminante co-extraído com o DNA, e responsável pela falha nas reações de PCR (TSAI e OLSON, 1992; TEBBE e VAHJEN, 1993).

As amostras de DNA purificadas apresentaram sucesso na amplificação por PCR, isto é, utilizando-se as técnicas SEL, DIR e PRO foi possível amplificar a região 16S do DNA ribossomal após purificação, para os dois tipos de solo estudados. Na Figura 21 podem ser verificadas bandas do produto de PCR com cerca de 200 pares de bases, como esperado ao se utilizar os *primers* BA338Fgc e UN518r, conforme Ovreas et al. (1997).

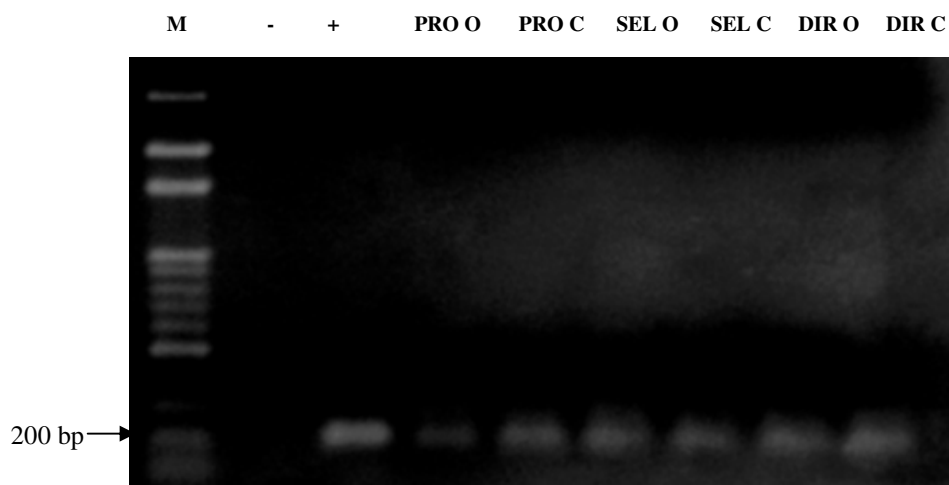


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados de PCR da região 16S rDNA (*primers* BA338Fgc e UN518r) a partir de amostras de DNA purificadas. Legenda: - controle negativo, + controle positivo com *Pseudomonas fluorescens*; PRO O/ PRO C - técnica Proposta em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; SEL O/ SEL C – técnica de Selbach em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; DIR O/ DIR C – técnica de Direito em solo sob manejo orgânico e convencional, respectivamente; M: marcador de peso molecular 100 bp.

5.5. Comparação geral das técnicas testadas

Apesar das técnicas SEL, DIR, PRO e KIT terem apresentado resultados similares após processo de purificação, há algumas diferenças em relação ao custo, ao uso de reagentes e tempo de execução.

Na tabela 8 é apresentada uma comparação entre as técnicas para seleção da mais adequada para análise dos solos estudados.

Em relação ao tamanho da amostra utilizada para a extração, em todas as técnicas utilizou-se 0,25 g de solo, o que favorece a repetição da análise, uma vez que quanto maior o número de amostras analisadas, melhor a representatividade da análise.

Apesar das técnicas SEL e DIR serem bastante similares, há diferenças importantes entre elas no que diz respeito ao uso de reagentes. A técnica DIR utiliza o dobro da concentração de lisozima, enzima utilizada para a realização da lise celular; os resultados apresentados, porém, mostram que este fato não melhorou a eficiência da lise

celular na extração, uma vez que a técnica SEL apresentou uma banda eletroforética mais intensa.

Tabela 8. Comparação entre os principais técnicas de extração de DNA de solo testadas.

<i>Técnicas</i>	<i>Lise celular</i>	<i>Remoção de restos celulares e substâncias húmicas</i>	<i>PCR após purificação Solo O / Solo C</i>	<i>Custo por amostra^b (reais)</i>	<i>Tempo gasto</i>
SEL	- Proteinase K - Lisozima (10 mg/ml) - Choque térmico	NaCl e CaCl ₂	+ / + ^a	6,28	3 horas*
DIR	- Proteinase K - Lisozima (20mg/ml) - Choque térmico	NaCl, CaCl ₂ e PVPP	+ / +	6,81	3 horas*
PRO	- Proteinase K - Lisozima (25 mg/ml) - Choque térmico	CaCl ₂ e PVPP	+ / +	6,68	1 hora e 30 minutos*
KIT	- <i>Bead beating</i> - ?	?	+ / +	26,54	1 hora e 30 minutos

^a - houve amplificação da amostra de DNA extraída do solo convencional sem a necessidade de purificação.

^b - custo estimado (junho-julho de 2006) dos reagentes da técnica e kit de purificação.

* - não considerando o tempo de aproximadamente 12 horas (de um dia para o outro) que a amostra foi deixada em freezer para a precipitação do DNA.

Outra modificação realizada por Direito et al. (2001) na técnica de SEL foi a adição de PVPP 4 % ao tampão fosfato, visando a obtenção de um produto mais puro, uma vez que o reagente se liga às moléculas dos ácidos húmicos, porém esse fato somente colaborou para diminuir o rendimento de extração, como já observado em outros trabalhos (ZHOU et al., 1996; ROBE et al., 2003). O PVPP, apesar de ser bastante utilizado para purificação das amostras na extração, pode causar perdas de DNA, por também se ligar às suas moléculas, fato que não é desejável.

O custo das técnicas por amostra também foi apresentado na Tabela 8, e mostra que as técnicas de “bancada” (SEL, DIR e PRO) são, aproximadamente, quatro vezes mais

baratas que o kit comercial. Esse fato é de extrema importância para o estudo, uma vez que trabalhos envolvendo biologia molecular geralmente apresentam alto custo. Por isso, apesar de apresentar grande facilidade de execução, o kit comercial pode ser substituído por outra técnica, de custo inferior, se o objetivo for desenvolver o trabalho em um laboratório que já possui os principais equipamentos e reagentes utilizados em biologia molecular e não há orçamento para a compra de kits específicos para solo, como ocorreu neste trabalho. Além disso, o kit comercial necessita de importação, sendo o custo variável com o câmbio.

Outro ponto central na discussão, e que merece atenção, é o tempo necessário para a realização de todo o processo de extração. Quanto menor o período gasto na metodologia, mais repetições podem ser realizadas, o que é importante na análise do solo, pois esse é bastante heterogêneo e necessita de grande número de análises. O kit comercial testado foi executado em menor tempo. Em relação às técnicas “de bancada”, a técnica PRO necessitou de menor tempo para sua execução, sendo que as técnicas SEL e DIR não diferiram no tempo gasto.

O objetivo central deste estudo, como já citado anteriormente, foi avaliar e apresentar alternativas de metodologias para avaliação da microbiota do solo através da análise do DNA extraído diretamente do ambiente, isto é, uma metodologia que possa ser aplicada a qualquer laboratório que possua materiais básicos utilizados em biologia molecular, sem a necessidade de adquirir kits ou equipamentos específicos para esse tipo de análise. Nesse contexto, a técnica PRO, proposta neste estudo, apresentou melhor perfil, graças ao custo relativamente baixo, tempo de aplicação reduzido e facilidade de execução. O DNA obtido necessitou apenas de um processo de purificação antes da amplificação por PCR.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- solos do mesmo tipo, porém com diferentes manejos, apresentam diferentes resultados de rendimento na extração de DNA, utilizando-se uma mesma técnica. O solo orgânico apresentou bandas mais intensas em todas as técnicas utilizadas, concordando com os maiores valores de biomassa microbiana encontrados neste solo;
- a técnica de Selbach apresentou ótimos resultados de rendimento, apresentando banda eletroforética intensa, sem arraste e solução de DNA clara, e após a purificação, o DNA, extraído dos dois solos estudados, pôde ser amplificado a partir de PCR.
- com a técnica de Direito, apesar de possibilitar menor rendimento do que o de Selbach, o DNA resultante também foi amplificado por PCR após purificação;
- a técnica aqui proposta (PRO), entretanto, destacou-se de todas as demais utilizadas neste estudo, por apresentar alto rendimento de extração, baixo custo, ser mais rápida e de mais fácil execução, necessitando de apenas uma etapa de purificação para apresentar resultado positivo para a amplificação por PCR;
- medidas de absorvância em espectrofotômetro a A_{260} para a quantificação do DNA e das relações A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} para análise de pureza do mesmo em solução, não foram eficientes devido à interferência causada pela alta concentração de ácidos húmicos em solução, este co-extraído durante o processo de extração de DNA diretamente do solo;

- este estudo demonstrou a necessidade de selecionar, adaptar e otimizar técnicas de extração de DNA para os solos do Brasil e pretendeu contribuir para o aperfeiçoamento de ferramentas moleculares visando a avaliação da diversidade microbiana do solo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, T.; LAUGHLIN, R. J. The effects of agronomy on the carbon and nitrogen contained in the soil biomass. **Journal of Agricultural Science**, v.97, p.319-327, 1981.

AGNELLI, A. ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M. T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.859-868, 2004.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R., **Microbial Ecology: fundamentals and applications**. 4th ed. Addison Wesley Longman. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc., 1997, 694p.

BAATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). **Water, Air and Soil Pollution**, v.47, p.325-375, 1989.

BAKKEN, L.R. Culturable and nonculturable bacteria in soil. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (eds.) **Modern Soil Microbiology**, Marcel Dekker, New York, 1997, p. 47-61.

BAKKEN, L.R.; LINDAHL, V. Recovery of bacterial cells from soil. In: TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. (eds.), **Nucleic Acids in the Environment**. Springer, Berlin, 1995, p. 9–27.

BEARE, M. H.; PARMELEE, R. W.; HENDRIX, P. F.; CHENG W. Microbial and faunal interactions and effects on litter nitrogen and decompositions in agroecosystems. **Ecological Monographs**, v.62, p.569-591, 1992.

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

BLAGODATSKAYA, E. V.; BLAGODATSKII, S. A.; ANDERSON, T. H. Quantitative isolation of microbial DNA from different types of soils of natural and agricultural ecosystems. **Microbiology**, v.72, n.6, p.744-749, 2003.

BRAID, M. D.; DANIELS, L. M.; KITTS, C. L. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. **Journal of Microbiology Methods**, v.52, p.389-393, 2003.

BULL, A. T.; WARD A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.573-606, 2000.

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

CAMPBELL, C. A.; BIEDERBECK, V. O. Soil bacterial changes as affected by growing season weather conditions: A field and laboratory study. **Canadian Journal of Soil Science**, v.56, p.293-310, 1976.

CEBOLLA, A.; VAZQUEZ, M. E.; PALOMARES, A. J. Expression vectors for the use of eukaryotic luciferase with different colors of luminescence. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.660-668, 1995.

CHO, J.C.; LEE, D.H.; CHO, Y.C.; CHO, J.C.; KIM, S.J. Direct extraction of DNA from soil for amplification of 16S rRNA gene sequences by polymerase chain reaction. **Journal of Microbiology**, v.34, p.229-235, 1996.

COURTOIS, S.; FROSTEGARD, A.; GORANSSON, P.; DEPRET, G.; JEANNIN, P.; SIMONET, P. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. **Environmental Microbiology**, v.3, n.7, p.431-439, 2001.

COUTINHO, H. L. C. **Avaliação da Biodiversidade do Solo através do Exame de DNA**, publicação do site: www.cnps.embrapa.br/search/pesqs/tema2/tema2.html, data de publicação 18/03/1999, consultado em 15/10/2004.

CRAWFORD, J. W.; HARRIS, J. A.; RITZ, K.; YOUNG, I. M. Towards an evolutionary ecology of life in soil. **Trends in Ecology and Evolution**, v.20, n.4, p.81-87, 2004.

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

CURTIS, T.P.; CRAINE, N.G. The comparison of the diversity of activated sludge plants. **Water Science Technology**, v.37, p.71-78, 1998.

DANIEL, R. The metagenomics of soil **Nature Reviews of Microbiology**, v.3, n.6, p.470-478, 2005.

DE MEY, M.; LEQUEUX, G.; MAERTENS, J.; DE MAESENEIRE, S.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. Comparison of DNA and RNA quantification methods suitable for parameter estimation in metabolic modeling of microorganisms. **Analytical Biochemistry**, v.353, n.2, p.198-203, 2006.

DIREITO, I. C. N.; SANTOS, S. T.; BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S. Otimização da técnica de extração de DNA de amostras de solo e da amplificação parcial dos genes nifH para avaliação de populações de bactérias diazotróficas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28, 2001, Londrina. **Resumos**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2001, p.72.

DODD, J. C.; BODDINGTON, C. L.; RODRIGUEZ, A.; GONZALEZ-CHAVEZ, C.; MANSUR, I.; Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. **Plant Soil**, v.226, p.131-151, 2000.

DONG, D.; HAIMING, A. Y.; ZHANG, X.; XU, Y. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, n.2 p.217-222, 2006.

DORAN, J. W. Microbial biomass and mineralizable nitrogen distributions in no-tillage and plowed soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.5, p.68-75, 1987.

DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; KEIJEZER-WOLTERS, A. C.; VAN ELSAS, J. D. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. **Journal of Microbiological Methods**, v.32, n.1, p.21-29, 1998.

ENGELEM, B.; MEIKEN, K.; WINTZINGERODE, F.; HEUER, H.; MALKOMES, H. P.; BACKHAUS, H. Monitoring impact of pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2814-2821, 1998.

ERB, R.W.; WAGNER-DOBLER, I. Detection of polychlorinated biphenyl degradation genes in polluted sediments by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, n.12, p.4065-4073, 1993.

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

FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.991-996, 1999.

FILION, M.; ST-AMAUD, M.; FORTIN, J. A. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. **New Phytology**, v.141, p.525-533, 1999.

FORTIN, N.; BEAUMIER, D.; LEE, K.; GREER, C.W. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.181-191, 2004.

FRASER, D. G.; DORAN, J. W.; SAHS, W. W.; LESOING, G. W. Soil microbial populations and activities under conventional and organic management. **Journal of Environmental Quality**, v.17, p.585-590, 1988.

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

GEORGE, E.; MARSCHNER, H.; JAKOBSEN, I. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorous and nitrogen from soil. **Critical Review of Biotechnology**, v.15, p.257-270, 1995.

GUNAPALA, N.; SCOW, K. M. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.30, p.805-816, 1998.

HE, J. **Molecular biological studies of soil microbial communities under different management practices in forest ecosystems of Queensland**, Queensland, Griffith University, p. 161, 2004 (Tese de doutorado).

HE, J.; XU, Z.; HUGHES, J. Pre-lysis washing improves DNA extraction from forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, n.12, p.2337-2341, 2005.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v.63 p.3233–3241, 1997.

HOLBEN, W. E. Isolation and purification of bacterial community DNA from environmental samples. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCNERLEY, M. J.; STETZEN-BACH, L. D.; WATER, M. W. (Eds.) **Manual of Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology, 1997, p.431-436.

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

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. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4495–4503, 2001.

JONSEN, K.; JACOBSEN, C. S.; TORSVIK, V. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, p.443-453, 2001.

JUNIPER, S. K.; CAMBON, M. A.; LESONGEUR, F.; BARBIER, G. Extraction and purification of DNA from organic rich subsurface sediments (ODP Leg 169S). **Marine Geology**, v.174, p.241-247, 2001.

KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, p. 243-248, 1995.

KENNEDY, A. C. SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v.170, n.1, p.75-86, 1995.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D.; Application of polimerase chain-reaction denaturing gradient gel eletrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprint. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, n.5, p.372-378, 2000.

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

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

LaMONTAGNE, M. G.; MICHEL, F. C.; HOLDEN, P. A.; REDDY, C. A. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v.49, p.255-264, 2002.

LEFF, L. G.; DANA, J.R.; MCARTHUR, J.V.; SHIMKETS, L.J. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1141-1143, 1995.

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

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

LLOYDE-JONES, G.; HUNTER, D. W. F. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.2053-2059, 2001.

LOVELL, C. R.; PICENO, Y. M. Purification of DNA from estuarine sediments. **Journal of Microbiological Methods**, v.20, p.161-174, 1994.

LUNDQUIST, E. J.; SCOW, K. M.; JACKSON, L. E.; UESUGI, S. L.; JOHNSON, C. R. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. **Soil Biology & Biochemistry**, v.31, p.1661-1675, 1999.

MALIK, M.; KAIN, C.; PETTGREW, C.; OGRAM, A. Purification and molecular analysis of microbial DNA from compost. **Journal of Microbiological Methods**, v.20, p.183-196, 1994.

MARTYNIUK, S.; WAGNER, G. H. Quantitative and qualitative examination of soil microflora associated with different management systems. **Soil Science**, v. 125, p.343-350, 1978.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 488p.

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

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Ed. UFLA, Lavras, 626p., 2002.

MUMY, K. L.; FINDLAY, R. H. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and qualitative-competitive PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.57, p.259-268, 2004.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.127-141, 1998.

NAKATSU, C. H.; TORSVIK, V.; OVREÅS, L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products. **Soil Science Society American Journal**, v.64, p.1328-1388, 2000.

NANNIPERI, P.; GRECO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biology activity in soil. In: BOLLAG, J. M.; STOTZKY, G. (eds.) **Soil Biochemistry**, v.4, Marcel Decker (ed.), p.293-337, 1989.

NIEMI, R. M.; HEISKANEN, I.; WALLENIS, K.; LINDSTROM, K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. **Journal of Microbiological Methods**, v.45, p.155-165, 2001.

O'DONNELL, A. G.; SEASMAN, M.; MACRAE, A.; WAITE, I.; DAVIES, J. T. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. **Plant Soil**, v.232, p.135-145, 2001.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.1499-1504, 2000.

OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis

of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.3367–3373, 1997.

PICARD, C.; PONSONNET, C.; PAGET, E.; NESME, X.; SIMONET, P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p.2717-2722, 1992.

PLANETA orgânico visita, disponível em <<http://www.planetaorganico.com.br/univalem1.htm>>. Acesso em: 20 de abril de 2005.

PORTEOUS, L. A.; ARMSTRONG, J. L. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. **Current Microbiology**, v.22, p.345-348, 1991.

PORTEOUS, L. A.; SEIDLER, R. J.; WATRUD, L. S. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. **Molecular Ecology**, v.6, p.787-791, 1997.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indicator of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, p.159-164, 1987.

RANJARD, L.; POLY, F.; COMBRISSE, J.; RICHAUME, A.; NAZARET, S. A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. **European Journal of Soil Biology**, v.34, n.2, p.89-97, 1998.

REBER, H. H. Simultaneous estimates of diversity and degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. **Biology Fertility Soils**, v.13, p.181-186, 1992.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v.39, p.183-190, 2003.

ROOSE-AMSALEG, C. L.; GARNIER-SILLAM, E.; HARRY, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. **Applied Soil Ecology**, v.18, p.47-60, 2001.

ROSA, M. M.; TAUK-TONISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Otimização de técnica para extração de DNA de solo de clima tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005 Santos, **Resumos**. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005.

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

ROSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v.25, p.39-67, 2001.

ROSZAK, D. B.; GRIMES, D. J.; COLWELL, R. R. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, n.3, p.334-338, 1985.

SAANO, A. TAS, E.; PIPPOLA, S.; LINDSTROM, K.; VAN ELSAS, J. D. Extraction and analysis of microbial DNA from soil, in: TREVORS, J. T.; VAN ELSAS, J. D. (Eds.), **Nucleic Acids in the Environment**. Springer, Berlin, Germany, pp. 49-67, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. 2nd ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SANTOS, S. T. **Comparação de métodos de extração de DNA de solo para estudos de diversidade microbiana por técnicas moleculares.** Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002, 86p. (Dissertação de Mestrado).

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.303-310, 2003.

SELBACH, P. A. **Optimization of a DNA extraction procedure for phylogenic probe analysis of soil microbial communities.** Wisconsin, University of Wisconsin, 1998, 127p. (Tese de doutorado).

SELENSKA, S.; KLINGMULLER, W. DNA recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil. **Letters of Applied Microbiology**, v.13, p.21-24, 1991.

SIGLER, W.V.; TURCO, R.F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Soil Ecology**, v.21, p.107-118, 2002.

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

SMIT, E., LEEFLANG, P., GLANDORF, B., VAN ELSAS, J.D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2614–2621, 1999.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v.23, p.249-261, 1997.

SMITH, J. L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimations. **Soil Biochemistry**, v.6, p.357-396, 1990.

SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annu. Rev. Phytopathol**, v.37, p.473-491, 1999.

SRIVASTAVA, D.; KAPOOR, R.; SRIVASTAVA, S. K.; MUKERJI, K. G. Vesicular arbuscular mycorrhiza – na overview. In: MUKERJI, K. G. (Ed.), **Concepts in Mycorrhizal Research**, Kluwer Academic Publishing, pp.1-39, 1996.

STACH, J.E.M.; BATHE, S.; CLAPP, J.P.; BURNS, R.G. PCR_SSCP comparison of 16SrDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v.36, n.2-3, p.139-144, 2001.

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

STENBERG, B. Monitoring Soil Quality of Arable Land: Microbiological Indicators. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science**, v.49, n.1, p.1-24, 1999.

STREIT, W.R.; SCHMITZ, R.A. Metagenomics - the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.492-498, 2004.

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

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.109-122, 1999.

TIMONEN, S.; JORGENSEN, K. S.; HAAHTELA, K.; SEN, R. Bacterial community structure at defined locations of *Pinus sylvestris* - *Suillus bovinus* and *Pinus sylvestris* - *Paxillus involutus* mycorrhizospheres in dry pine forest humus and nursery peat **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, n.6, p.499-513, 1996.

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

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.240-245, 2002.

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

TREVORS, J.T.; J.D. VAN ELSAS, A review of selected methods in environmental microbial genetics. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p.895-902, 1989.

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

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

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VIESTEL, M. A. D. **Método rápido de extração de DNA em solos tropicais**, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995, 90p. (Dissertação de Mestrado).

VOLOSSIOUK, T.; ROBB, E.J.; NAZAR, R.N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p.3972-3976, 1995.

WALIA, S.; KHAN, A.; ROSENTHAL, N. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, n.1, p.254-259, 1990.

WECHTER, P.; WILLIAMSON, J.; ROBERTSON, A.; KLUEPFEL, D. A rapid, cost-effective procedure for the extraction of microbial DNA from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.85-91, 2003.

WELLINGTON, E.M.H.; MARSH, P.; WATTS, J.E.M.; BURDEN, J. Indirect approaches for studying soil microorganisms based on cell extraction and culturing. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Eds.), **Modern Soil Microbiology**. Marcel Dekker, Inc, New York, p. 311–329, 1997.

WESTERGAARD, K.; MULLER, A.K.; CHRISTENSEN, S.; BLOEM, J.; SORENSEN, S.J. Effects of tylosin on the soil microbial community. **Journal of Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.2061–2071, 2001.

WILSON, J. B. Shoot competition and root competition. **Journal of Applied Ecology**, v.25, n.1, p. 279-296, 1988.

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

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v. 198, p.97-107, 1998.

YAO, H.; HE, Z.; WILSON, M. J.; CAMPBELL, C. D. Microbial biomass and community structure in sequence of soils with increasing fertility and changing land use. **Microbiol Ecology**, v.40, p.223-237, 2000.

YEATES, C.; GILLINGS, M. R.; DAVISON, A. D.; ALTAVILLA, N.; VEAL, D. A. Methods for microbial extraction from soil for PCR amplification **Biology Procedures Online**, 1998, Vol. 1, No. 1, www.biologicalprocedures.com, acesso em 03/03/04.

ZHOU, J.; TIEDJE, J. M. Gene transfer from a bacterium injected into na aquifer to an indigenous bacterium. **Molecular Ecology**, v,4, p.613-618, 1995.

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

APÊNDICE

Preparo de reagentes

- **Tris-HCl 1 M pH 8,0** (solução estoque): em 800 ml de água foram dissolvidos 121,1 g de Tris-base, e o pH foi ajustado a 8, adicionando aproximadamente 42 ml de HCl. O volume foi ajustado para 1000 ml com água. A solução foi dividida em alíquotas e esterilizada em autoclave.
- **EDTA 0,5 M pH 8,0**: 186,1 g de EDTA.2H₂O foram adicionados a 800 ml de água e a suspensão foi agitada vigorosamente. O pH foi ajustado para 8,0 com adição de NaOH (aproximadamente 20g). O volume da solução foi ajustado para 1000 ml, dividida em alíquotas e esterilizada em autoclave.
- **Fenol saturado com Tris-HCl 0,5 M pH 8**: a partir do fenol liquefeito e armazenado a -20°C, este é deixado em temperatura ambiente e adicionado hidroxiquinolina até concentração final de 0,1%. Adiciona-se um volume de Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, agita-se a mistura por 15 minutos, deixe descansar por alguns minutos e retire a parte superior. Esse procedimento deve ser repetido até pH 7,8. Após a saturação, adicionar 0,1 volume de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0.
- **Clorofórmio : Álcool Isoamílico (24:1)**: misturar 24 partes de clorofórmio com 1 parte de álcool isoamílico.
- **Lisozima (25 mg/ml)**: 25 mg de lisozima sólida (pó liofilizado) foram dissolvidas em 1 ml de solução Tris-HCl 10 mM pH 8,0, imediatamente antes de ser utilizada.
- **Proteinase K (20 mg/ml)**: 20 mg de proteinase K (pó liofilizado) foram dissolvidos em 1 ml de solução de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e Acetato de Cálcio 1,5 mM. A solução foi dividida em alíquotas de 100 µl e estas armazenadas a -20°C.

- **Cloreto de cálcio 3 M** : 88,2 g de cloreto de cálcio em pó foram dissolvidos em água até volume de 20 ml. A solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μm , dividida em alíquotas de 1 ml e armazenada em geladeira (aproximadamente 4°C).
- **Dodecil sulfato de sódio - SDS 10% (p/v)**: 100 g de SDS em pó foram dissolvidos em 900 ml de água destilada, filtrada e esterilizada (água pura), com ajuda de aquecimento (68°C) e agitador magnético para melhor dissolução. O pH foi ajustado para 7,2 com adição de gotas de HCl concentrado. O volume foi ajustado para 1000 ml de água pura e armazenada em temperatura ambiente.
- **Dodecil sulfato de sódio - SDS 20% (p/v)**: 200 g de SDS em pó foram dissolvidos em 900 ml de água destilada, filtrada e esterilizada (água pura), com ajuda de aquecimento (68°C) e agitador magnético para melhor dissolução. O pH foi ajustado para 7,2 com adição de gotas de HCl concentrado. O volume foi ajustado para 1000 ml de água pura e armazenada em temperatura ambiente.
- **Tampão fosfato de sódio (SPB) 0,12 M pH 8,0**: preparar solução de Na_2HPO_4 e solução de NaH_2PO_4 , sendo as duas na concentração 1 M (solução estoque). Adicionar Na_2HPO_4 na solução de NaH_2PO_4 até que o pH esteja em 8,0. Para uso, diluir a solução 1 M para 0,12 M.
- **Tampão fosfato de potássio (PPB) 0,2 M pH 7,2**: preparar solução de K_2HPO_4 e solução de KH_2PO_4 , sendo as duas na concentração 1 M (solução estoque). Adicionar K_2HPO_4 na solução de KH_2PO_4 até que o pH esteja em 7,2. Para uso, diluir a solução 1 M para 0,2 M.
- **CTAB 10%**: adicionar 10 g de CTAB em água até volume final de 100 ml.
- **CTAB 10% em NaCl 0,7 M**: dissolver 4,1 g de NaCl em 80 ml de água. Adicionar devagar 10 g de CTAB aquecendo a reação a 55°C e agitando. Ajustar até volume de 100 ml com água.

- **Tampão CTAB:** Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; EDTA 0,02 M; CTAB 2%; NaCl 1,4 M.
- **Solução PVPP / PPB:** 0,1 g de PVPP em pó é dissolvido em 1 ml de tampão PPB. A solução deve ser agitada imediatamente antes de ser utilizada, pois o PVPP não é totalmente solúvel no tampão, e acaba ocorrendo a precipitação do reagente.
- **Solução de lise:** Tris-HCl 0,01 M pH 8,0; lisozima 10 mg/ml (para a técnica SEL) ou 20 mg/ml (para a técnica DIR); CaCl₂ (60 a 90% da CTC do solo).
- **Solução de SDS:** NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,5 M pH 8,0; SDS 10%.
- **Tris EDTA (TE) pH 8,0:** Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e EDTA 10 mM pH 8,0.
- **Tampão 50/50:** Tris-HCl 50mM pH 8,0 e EDTA 50mM pH 8,0.
- **Agarose 0,8%:** 0,8g de agarose para cada 100ml de tampão TEB. Dissolver aquecendo até a solução parecer totalmente transparente.
- **Gel loading buffer (Tampão de corrida para eletroforese) 6X:** 0,25% (p/v) de azul de bromofenol, 0,25% (p/v) de xileno cianol, 15% (p/v) de Ficoll, em água pura.
- **TEB (solução estoque 5X):** Dissolver 54g de Tris base, 27,5g de Ácido Bórico e 20ml de EDTA 0,5M pH 8, em água, para volume final de 1 litro. Não autoclavar. Filtrar em membrana de 0,22µm.
- **Solução TBE + Brometo de etídeo:** 3µl de brometo de etídeo (50mg/ml) para cada 100ml de tampão TEB 1X.

É importante citar que todos os reagentes sólidos foram pesados em balança analítica (Explorer – Ohaus), e as soluções foram preparadas segundo Sambrook et al. (1989) e diluídas utilizando-se água destilada, filtrada em aparelho Milli-Q (Millipore) e autoclavada por 25 minutos a 120°C a 1 atm.