

# **Monitoramento molecular da comunidade bacteriana durante a biorremediação de solos multi-contaminados**

## **Molecular tools to monitor bacterial communities during the bioremediation of multi-contaminated soils**

**Sandy Sampaio Videira**

Bolsista PCI, Eng. Agrônoma, D.Sc.

**Cláudia Duarte da Cunha**

Supervisora, Eng. Química, D. Sc.

### **Resumo**

Nos últimos anos houve grandes avanços no entendimento dos mecanismos de biorremediação ambientes contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Além disso, avanço significativo também tem sido observado nas técnicas utilizadas para monitoramento desses processos em solos contaminados, principalmente em função da aplicação de métodos independentes de cultivo. Estudos de ecologia molecular em ambientes contaminados podem ser influenciados por mudanças na eficiência de extração de DNA do solo causada pela adsorção de DNA aos contaminantes e/ou minerais do solo. Para examinar até que ponto isso pode ocorrer, foram testados três kits comerciais para extração de DNA de solo, FastDNA), DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit e ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit. Os kits foram testados utilizando-se os protocolos originais com e sem modificações. A eficiência das extrações de DNA foi avaliada em duas classes de solos com mineralogias distintas, sem contaminação e após processo de biorremediação de óleo combustível e níquel. A quantificação do DNA por fluorimetria e a amplificação do gene 16S rRNA foram os parâmetros utilizados para avaliar a eficiência das extrações de DNA. Os resultados mostraram que a extração foi fortemente influenciada pela classe de solo, pelo kit de extração usado e pelas modificações dos protocolos originais. O protocolo modificado do kit FastDNA mostrou-se mais eficiente na extração de DNA de ambos os solos e, conseqüentemente, na amplificação do gene 16S rRNA. Os dados mostram que, possivelmente, a composição mineralógica dos solos é um fator que influencia significativamente a eficiência de extração de DNA de solos usando kits comerciais.

Palavras-chave: extração de DNA, kits comerciais, gene 16S rRNA, DNA adsorção, argilominerais, óxidos

### **Abstract**

In recent years there has been great progress in understanding the mechanisms of bioremediation of environments contaminated with hydrocarbons and heavy metals. In addition, significant advances have also been observed in techniques used to monitor these processes in contaminated soils, mainly by the use of culture-independent approaches. Molecular ecology studies in contaminated environments may be influenced by changes in soil DNA extraction efficiency caused by DNA adsorption to soil contaminants and/or minerals. To

examine the extent to which this might occur, we tested three commercial DNA extraction kits, FastDNA® Spin (MP Biomedicals), DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen) and ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (ZymoResearch). The kits were tested using the original protocols and some modifications. The efficiency of the DNA extractions was evaluated in two classes of soils with different mineralogical attributes, without contamination and after bioremediation process. Quantification of DNA by fluorimetry and amplification of the 16S rRNA gene were the parameters used to evaluate the efficiency of DNA extractions. The results showed that the extraction was strongly influenced by soil class, kit used and modifications of the original protocols. The modified protocol of the FastDNA kit proved to be more efficient in DNA extracting from both soils and consequently in 16S rRNA gene amplification. The data show that, possibly, the mineralogical composition of soils is a factor that influences significantly the efficiency of DNA extraction from soils using commercial kits.

Key words: DNA extraction, commercial kits, 16S rRNA gene, DNA adsorption, clay minerals, oxides

## 1. Introdução

Micro-organismos são elementos-chave para diversos processos biogeoquímicos que conduzem a vida na Terra. Os solos são um dos mais diversos biomas encontrados na Terra e um grande reservatório da diversidade microbiana. Além de serem essenciais nos processos biogeoquímicos, os micro-organismos do solo desempenham um importante papel em outros processos, incluindo a biorremediação (Dangi et al., 2018). A biorremediação assistida por micro-organismos tem sido uma alternativa às abordagens convencionais de remediação, no entanto, em alguns casos, os micro-organismos testados *in vitro* mostram-se ineficazes em condições de campo. Uma das hipóteses que justificam essa inconsistência nos resultados, é que os micro-organismos isolados nem sempre representam aqueles que, de fato, atuam nos processos *in locu*. Desta forma, entender sobre os mecanismos microbianos por trás destes processos não tem sido uma tarefa fácil, uma vez que a maioria dos micro-organismos são ainda não cultiváveis. Neste sentido, a introdução de metodologias independentes de cultivo – baseadas em análises de DNA e RNA – tem revolucionado os estudos e ampliado o entendimento da ecologia microbiana nos ambientes, incluindo os solos. Isto se dá, principalmente, pela otimização das tecnologias e maior acessibilidade ao sequenciamento de alto rendimento ou nova geração (SNG), que tem possibilitado a caracterização das comunidades microbianas sem a necessidade de conhecimento prévio e em escalas relevantes ecologicamente (Dimitriv et al., 2017).

Em função de sua estabilidade, o DNA tem sido amplamente usado para caracterizar as comunidades microbianas, fornecendo esclarecimentos de grande relevância a respeito da abundância, diversidade e potencial funcional das comunidades microbianas. Portanto, a caracterização bem-sucedida dessas comunidades depende diretamente da quantidade e qualidade do DNA obtido das amostras de interesse. Com a introdução dessas metodologias independentes de cultivo, uma variedade de protocolos de extração de DNA de solo tem sido desenvolvida, contemplando basicamente duas abordagens: (i) extração direta, onde as células microbianas são lisadas na própria matriz do solo e (ii) a extração indireta, onde as células são primeiramente separadas da matriz do solo e subsequentemente lisadas. Os métodos de extração indireta são considerados

demorados e podem variar bastante em função do tipo de solo, por isso são menos utilizados. Os métodos de extração direta, são prejudicados pela co-extração de substâncias orgânicas, como ácidos húmicos que podem inibir as reações de PCR, e/ou pela composição mineralógica, uma vez que o DNA pode ficar adsorvido nas partículas do solo e, conseqüentemente, diminuindo a eficiência de extração (Saiki e Kunito, 2010).

Embora numerosos protocolos tenham sido publicados para extração de DNA de solos, em função da grande diversidade de solos com características físicas, químicas e biológicas particulares, ainda existe grande esforço para otimizar a extração e os procedimentos de purificação do DNA. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de kits comerciais para extração de DNA de solos com características físico-químicas distintas visando posterior análise metagenômica.

## 2. Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de kits comerciais para extração de DNA de solos em amostras com mineralogias distintas, sem contaminação e após processo de biorremediação de óleo combustível e níquel, a fim de obter DNA com qualidade e quantidade satisfatórios para realização de testes subsequentes de metagenômica.

## 3. Material e Métodos

Amostras do horizonte B de duas classes de solos - Latossolo (22°41'34.2"S, 43°17'14.5"W) e Chernossolo (22°51'22.5"S, 43°30'0.7"W) - foram coletadas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Os procedimentos de coleta e análises físico-químicas dos solos, bem como os ensaios de biorremediação estão descritos em Timoteo (2018).

O DNA dos solos foram extraídos, em triplicata, usando 3 kits comerciais: (i) FastDNA® Spin (MP Biomedicals), utilizado por grande parte dos artigos disponíveis na literatura, (ii) DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen), recomendado pelo *Earth Microbiome Project* e (iii) ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (ZymoResearch), desenvolvido para análises de microbioma e metagenômica. As extrações foram realizadas de acordo com o protocolo original dos fabricantes e, as modificações foram baseadas no protocolo descrito por Dimitriv et al. (2017). A etapa de lise mecânica, utilizando o FasPrep24 instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), foi padronizada com 6.5 m s<sup>-1</sup> por 45 segundos para todos os kits testados. As modificações dos protocolos originais basearam-se no uso de três extrações sucessivas de DNA a partir de uma única amostra. Após a etapa de lise mecânica, o sobrenadante foi retirado e utilizado na primeira extração (E1). Os tubos contendo o material remanescente, microesferas mais solo, foram mantidos no gelo até o início da extração subsequente (E2). Para começar a segunda extração (E2), os tampões de extração de cada kit específico foram adicionados aos tubos (conforme instruções do fabricante) contendo as microesferas e o solo e nova lise mecânica foi realizada. O sobrenadante foi removido e uma terceira extração foi realizada (E3) conforme E2. A quantidade total de DNA obtido foi mensurada através do fluorímetro Qubit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

As reações de amplificações da região V3 do gene 16S rRNA foram realizadas num volume final de 25  $\mu$ L contendo a mistura de 2,5  $\mu$ L de tampão 10 x, 1,25  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (50 mM), 0,5  $\mu$ L de dNTP (10 mM), 0,5  $\mu$ L BSA (20 mg.mL<sup>-1</sup>), 0,5  $\mu$ L dos iniciadores 806R (GACTACHVGGGTWTCTAAT) e 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) (10  $\mu$ M), 0,25  $\mu$ L Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (5U. $\mu$ l<sup>-1</sup>) (Invitrogen) e 3  $\mu$ L de DNA (diluído 3x). As condições de PCR foram uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 min., 50°C por 45 seg., 72°C por 45 seg., e extensão final a 72°C por 7 min.. Um volume de 5  $\mu$ L dos produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e a migração foi realizada em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE1X) sob voltagem de 100V por 35 min. O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen) e visualizado em sistema de fotodocumentação Nugenius.

#### 4. Resultados e Discussão

De maneira geral, os kits testados para extração de DNA de latossolo e chernossolo mostraram baixo rendimento na quantidade de DNA obtido, com exceção das extrações E2 e E3 usando o kit FastDNA para as amostras de chernossolo (Figura 1A) com médias que variaram de 55 a 150 ng de DNA por ml. Surpreendentemente, as extrações E2 e E3 deste kit foram as únicas que obtiveram sucesso na extração de todas as amostras de latossolo, mesmo apresentando valores baixos, com médias entre 0,5 e 11 ng de DNA por ml (Figura 1B). O kit PowerSoil só extraiu DNA das amostras de chernossolo, mais efetivamente para as amostras (3 e 4) multi-contaminadas submetidas ao processo de biorremediação (Figura 1C). Para o latossolo, o método de quantificação utilizado não detectou DNA em nenhuma das amostras testadas com o kit PowerSoil (Figura 1D). O kit ZymoBIOMICS mostrou grande variabilidade entre as amostras com rendimento extremamente baixo para ambos os solos testados, com médias que variaram de não detectável a 2,1 ng de DNA por ml (Figura 1D e E). Vale ressaltar que as extrações denominadas E1 são baseadas nos protocolos originais de cada kit testado, enquanto as extrações E2 e E3 são os protocolos modificados.

Os resultados de extração e quantificação mostraram alta correlação com os resultados de amplificação do gene 16S rRNA. Utilizando-se o kit FastDNA, foi possível amplificar as amostras de chernossolo das extrações E1, E2 e E3, sendo E2 e E3 com maior rendimento. Já as amostras de latossolo, mostraram resultados de amplificação positivos para as extrações E2 e E3, sendo E3 aquela com 100% de aproveitamento (Figura 2A e B). Já o kit PowerSoil, embora a quantidade de DNA tenha sido ~10 vezes menor que as obtidas com o kit FastDNA, mostrou amplificação para as amostras de chernossolo (Figura 2C e D), mais significativamente para as amostras 3 e 4 (multi-contaminadas submetidas ao processo de biorremediação), que mostraram maiores quantidades de DNA (Figura 1C). Para as amostras de latossolo, onde não foi possível detectar a presença de moléculas de DNA pelo método usado, não mostraram amplificação nas condições testadas. Os testes com o kit ZymoBIOMICS, apesar de apresentar rendimento extremamente baixo na extração de DNA, mostrou amplificação para algumas amostras de chernossolo e latossolo, principalmente na E2 (Figura 2E e F).

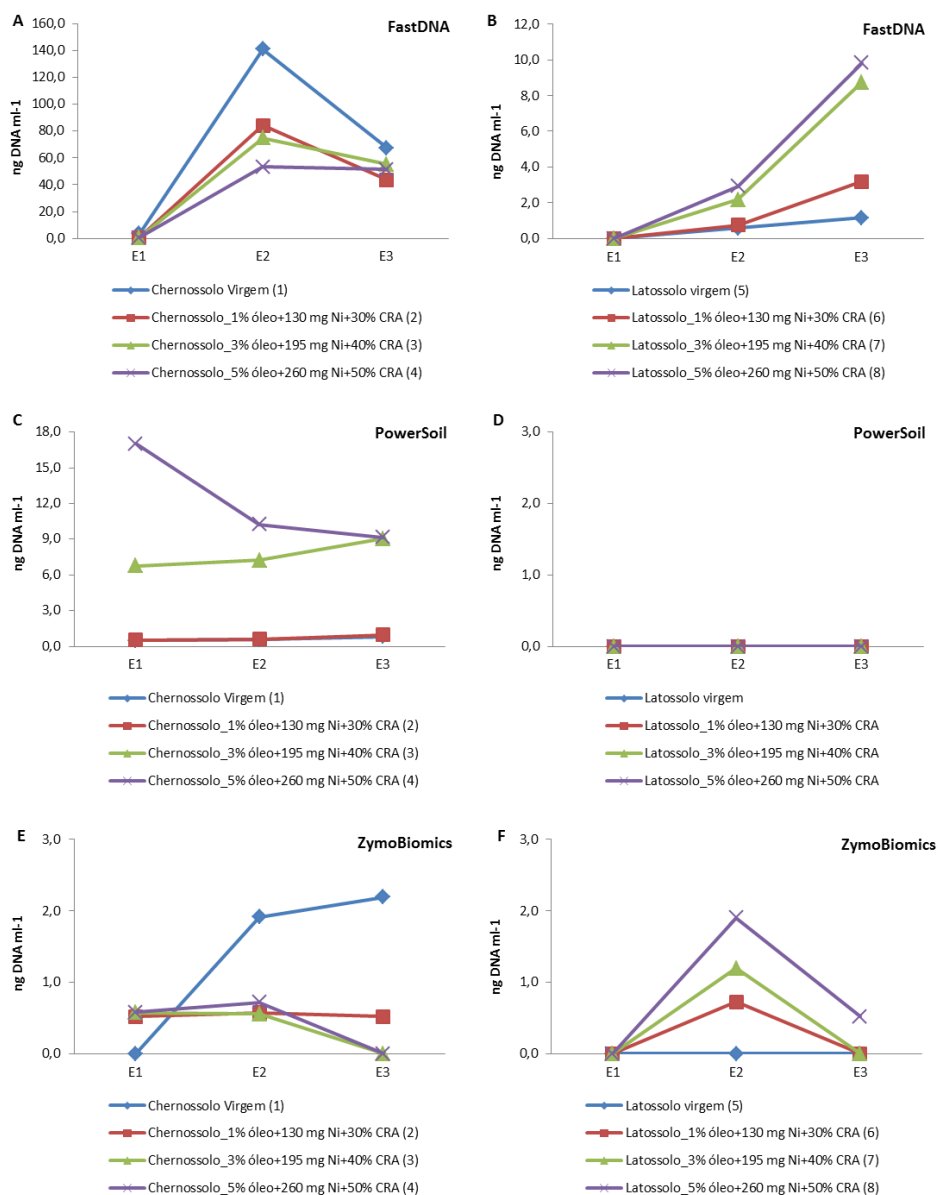


Figura 1 – Quantidade de DNA obtido nas extrações sucessivas de chernossolo (1-4) e latossolo (5-8) usando os kits FastDNA, PowerSoil e ZymoBIOMICS. Os valores representam a média de 3 replicatas biológicas de cada amostra. A quantificação das amostras de DNA foi realizada usando Qubit 2.0 fluorômetro.

A princípio, havia uma hipótese de que a presença de contaminantes nos solos testados poderia diminuir a eficiência da extração de DNA. Entretanto, não foi possível identificar relação entre os diferentes níveis de contaminação e a quantidade de DNA e a amplificação do gene 16S rRNA. Por outro lado, analisando os resultados simultaneamente, é possível observar que a classe de solo e os protocolos utilizados foram os parâmetros que mais interferiram na eficiência das extrações. As amostras de chernossolo revelaram maiores quantidades de DNA nas extrações E2 e E3 quando comparada com E1, mas este fato não interferiu na amplificação do gene de interesse. Já para as amostras de latossolo, somente foi possível obter DNA e amplificar o gene de interesse nas extrações E2 e E3, com melhores resultados para o kit FastDNA. Com

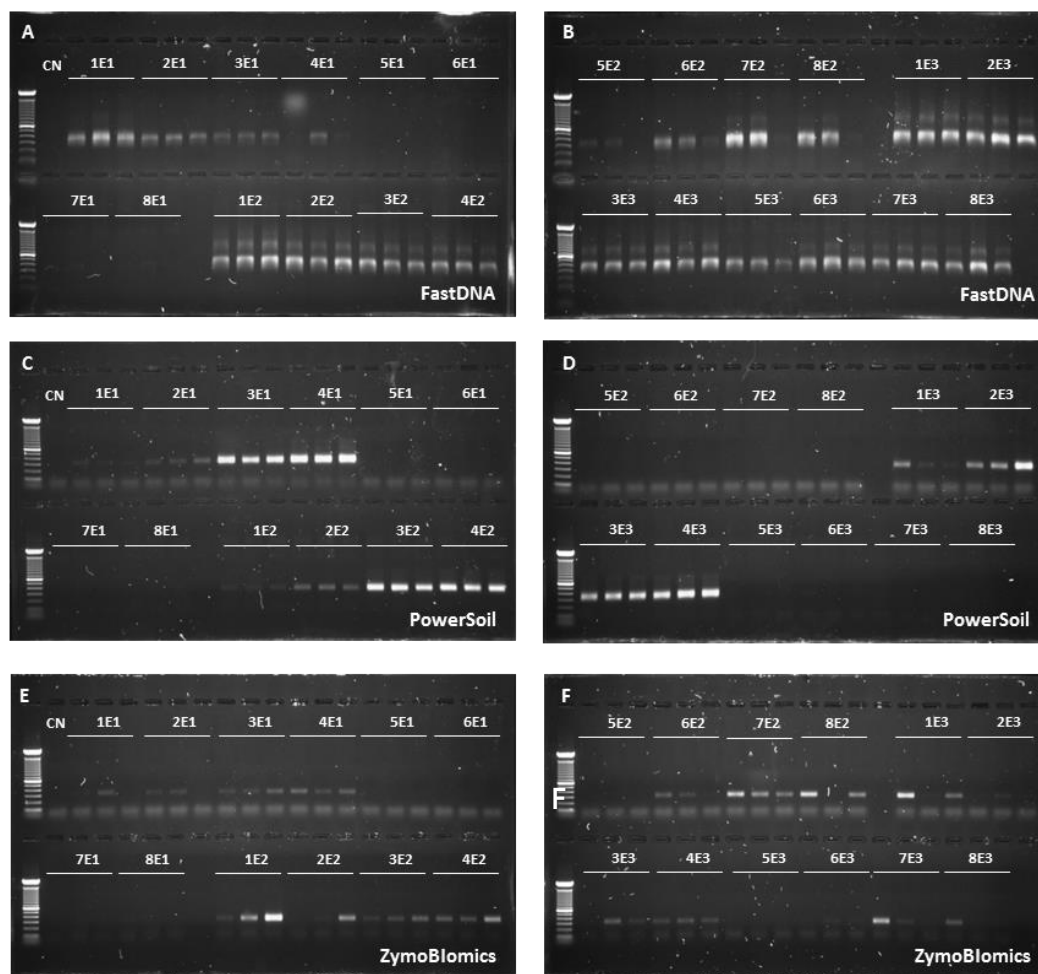


Figura 2 – Gel de agarose 1% com os produtos de amplificação do gene 16 rRNA das extrações sucessivas (E1, E2 e E3) de chernossolo (1-4) e latossolo (5-8) usando os kits FastDNA, PowerSoil e ZymoBIOMICS. As amostras foram amplificadas usando triplicata biológica. O marcador molecular utilizado foi 100 pb DNA ladder e as bandas encontram-se na altura de 300 pares de base.

base nesses resultados, é possível concluir que a utilização do protocolo original dos kits testados não seria recomendada para solos com as mesmas características que o latossolo usado neste estudo.

Em estudos anteriores, Timóteo (2018), fez a caracterização completa das amostras do horizonte B das duas classes de solos usadas, e mostrou que uma das principais diferenças entre elas, além dos níveis de fertilidade que influencia diretamente na qualidade dos solos e conseqüentemente na quantidade e diversidade de microorganismos presentes, é a composição mineralógica. As amostras de latossolo apresentam maiores quantidades de argilominerais 1:1 como a caulinita e óxidos, principalmente de silício, alumínio e ferro, os quais contribuem para o aumento das cargas positivas no solo. Já o chernossolo apresenta baixa quantidade de caulinita e elevados teores de vermiculita, argilomineral 2:1 que favorece o aumento de cargas negativas do solo. Analisando estas informações, é possível observar que as amostras de latossolo utilizadas apresentam em sua composição maior quantidade de minerais com elevada superfície específica, baixa capacidade de troca catiônica (CTC) e alta probabilidade de apresentar predominância de carga positivas (CTA) determinado pelo

potencial Zeta, caracterizando estas amostras como um solo de cargas variáveis. Nessas condições, há maior retenção de ânions, e levando em consideração que o DNA é uma molécula com carga negativa, é provável que após a lise das células, o DNA liberado para o meio fique adsorvido às partículas podendo, assim, ser preservado. A maioria dos estudos usa argilominerais 2:1, como partícula adsorvente, para entender a adsorção do DNA nos solos, no entanto, estes resultados não são suficientes para elucidar o estudo de adsorção de DNA em solos com cargas variáveis. Saiki e Kunito (2010) descrevem diferentes possibilidades de adsorção das moléculas de DNA em constituintes de solos de cargas variáveis. Eles sugerem que a adsorção do DNA depende de vários fatores, mas está mais relacionada às cargas na superfície dos minerais do que a superfície específica. Desta forma, é provável que estes fatos expliquem a necessidade de 2 e/ou 3 etapas de lise mecânica sucessivas para liberação de DNA das amostras de latossolo testadas. No entanto, novos ensaios e análises precisam ser realizados para comprovação desta hipótese.

## 5. Conclusão

- Os kits comerciais utilizados para extração de DNA de amostras de solos devem ser criteriosamente selecionados, uma vez que a eficiência de extração varia em função da composição física, química e biológica dos solos.
- Em análises independentes de cultivo, os tipos de minerais presentes nos solos podem reter moléculas de DNA durante as etapas de lise e, conseqüentemente, subestimar a comunidade microbiana presente nas amostras.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Tecnologia Mineral, CETEM, pela disponibilização da infraestrutura para condução dos experimentos e análises e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida para desenvolvimento do projeto. Agradecemos também a Dayse Mirella Oliveira Timóteo por ceder as amostras de solos para realização deste trabalho.

## 7. Referências Bibliográficas

DIMITROV, M.R.; VERAART, A.J.; DE HOLLANDER, M.; SMIDT H.; VAN VEEN J.A.; KURAMAE E.E. Successive DNA extractions improve characterization of soil microbial communities. **Peer Journal**, v.5:e2915, 2017.

DANGI, A. K.; SHARMA, B.; HILL R. T.; SHUKLA P. Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach, **Critical Reviews in Biotechnology**, v.9, p.1-20, 2018.

SAEKI, K.; KUNITO, T. Adsorptions of DNA molecules by soils and variable-charged soil constituents. In **Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, edited by Mendez-Vilas A. pp 188–195, 2010.