



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Relatório de Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório:
Escola Superior de Agricultura ãLuiz de Queirozö/USP**

CAIO CÉSAR GOMES FREITAS

Garanhuns - Pernambuco
Junho ó 2018

CAIO CÉSAR GOMES FREITAS

**Relatório de Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório:
Escola Superior de Agricultura ãLuiz de Queirozö/USP**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, como parte das exigências do Curso de Graduação em Agronomia para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral ó UAG/UFRPE

Garanhuns - Pernambuco
Junho ó 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

F866r Freitas, Caio César Gomes

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório :
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP / Caio
César Gomes Freitas. - 2018.

30 f. : il

Orientadora: Júlia Kuklinsky Sobral.

Trabalho de ESO (Estágio Supervisionado Obrigatório : Curso
de Agronomia) . Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Agronomia, Garanhuns, BR - PE, 2018.

Inclui referências e apêndices

1. Biologia Molecular 2. Reação em cadeia de polimerase
3. Microbiologia do solo I. Sobral, Júlia Kuklinsky, orient. II. Título

CDD 631.46

CAIO CÉSAR GOMES FREITAS

**Relatório de Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório:
Escola Superior de Agricultura ãLuiz de Queirozö/USP**

Relatório aprovado em 18 / 06 / 2018

Maria Jacyelle dos Santos Muniz

Mestre em Produção Agrícola - UFRPE/UAG

João Tiago Correia Oliveira

Doutor em Zootecnia ó UFRPE

Prof.^a Dr.^a Júlia Kuklinsky Sobral ó UFRPE/UAG

Orientadora

IDENTIFICAÇÃO

Nome do discente: Caio César Gomes Freitas

Curso: Agronomia

Matrícula: 09720433493

Tipo de estágio: Supervisionado Obrigatório

Área de conhecimento: Microbiologia do Solo

Instituição: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo (ESALQ / USP)

Setor: Laboratório de Microbiologia do Solo

Supervisor: Prof. Dr. Fernando Dini Andreote

Função: Professor

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Júlia Kuklinsky Sobral

Período de realização: 23/04/2018 a 10/06/2018

Total geral de horas: 210 horas

A meu pai, José Lucinaldo, por durante todos os momentos de minha vida, até então, mostrar através do seu exemplo, a importância dos estudos...

DEDICO

A minha mãe, Maria do Socorro, que com todo seu amor e ternura, fez minha vida sempre ser mais leve. Meu querido irmão Caique, minha querida irmã Catarine e meu sobrinho, meu afilhado meu pequeno, meu xodó, Davi...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento, é algo que aprendi ao longo da vida o quanto pode ser significativo. Esse trecho da escrita, é a parte do relatório obrigatório, porém não menos importante, talvez até mais! É algo que me traz uma série de sensações. Durante essa escrita, me veio saudade, me veio boas risadas, me veio emoção, enfim! Um dia assistindo a uma entrevista num canal de esportes, vi o treinador da seleção campeã olímpica de vôlei feminino, José Roberto Guimarães, dizer que o que mais fazia-lhe feliz, era quando alguém chegava para ele e dizia: ôZé... Obrigado! Você foi importante pra mim neste ou naquele outro momento. Quando ouvi isso na entrevista pensei, o quanto pode valer um agradecimento e o quanto este sentimento de gratidão pode ser significativo, quando tal se trata de algo que nos ajudou em algum momento de nossa vida, seja por uma atitude, seja por conselhos, por um aprendizado ou palavras amigas. Então, neste momento tão importante da minha vida, tenho muito a agradecer a várias pessoas...

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter colocado tantas pessoas especiais na minha vida, desde muito novo.

Agradeço a meu pai, José Lucinaldo, por todo amor, por ser meu herói, meu melhor amigo e por tantos ensinamentos, a maioria deles, em forma de exemplo. A minha mãe, Maria do Socorro, por todo amor, por me mostrar que sempre devemos buscar as coisas boas na vida, sempre olhar com carinho para o que está ao nosso redor e por sempre fazer o máximo para deixar minha vida mais leve. Aos meus irmãos, Caique e Catarine, por todo carinho, por toda fraternidade, por toda uma infância. A minha cunhada, Tati, que entrou na nossa família de maneira inesperada, porém com o melhor presente que poderíamos ter recebido, além de quê, de brinde, ganhei mais uma irmã. Ao meu sobrinho, o pequeno Davi, por me proporcionar um sentimento quase que inexplicável... Não sei como é o sentimento de ser pai, deve ser algo mágico, mas até então, digo e reafirmo que a melhor coisa do mundo, é ser o ótio Taio!

Agradeço a Dona Ivanilda e a sua família, que tanto me ensinaram, permitindo que eu pudesse entrar em suas vidas. Fato que aconteceu quando eu ainda era muito novo, então sou muito grato por todo carinho, amizade, consideração e por a senhora e sua família terem me proporcionado tantos aprendizados.

Agradeço a Professora Júlia por todo aprendizado. A senhora sempre foi um

porto seguro, sempre foi muito bom falar com a senhora, era algo que sempre dava uma paz... Muito obrigado por ter acreditado no meu potencial, pelo exemplo de pessoa e profissional que és e por palavras em momentos muito importantes, algo que jamais esquecerei.

Agradeço a todos aqueles que são PET Biotecnologia. Afinal de contas, esse grupo me fez crescer muito, não só profissionalmente, mas também pessoalmente, e isso, se deve pelo dia a dia e aprendizado com todos os amigos que eu tive o prazer de conviver por lá. Desde o início da graduação, eu queria ser ativo dentro da Universidade! E enxerguei essa possibilidade dentro do grupo PET Biotecnologia. Para minha alegria, fui selecionado. Não sabia eu, que este grupo me proporcionaria muito, mas muito mais do que eu imaginava... No PET eu não tinha que necessariamente, ser sempre um bom aluno, no sentido de ser o mais aplicado. Lá eu podia tocar violão, brincar de ser poeta, entre tantas outras coisas que me enchiam de alegria e orgulho em ser PETIANO! Certamente, carregarei a bandeira do PET Biotecnologia por toda a vida, e levarei comigo todo o aprendizado.

Agradeço a todos aqueles que são LGBM, por terem me mostrado a importância da pesquisa, por terem ajudado para que eu pudesse despertar para esse lado, o qual pretendo seguir por toda uma vida profissional, e claro, por toda amizade.

Agradeço a minha turma, a lendária turma Agronomia 2013.2, por serem companheiros de um dia a dia. Dia a dia esse, que foi difícil, repleto de desafios, porém muito prazeroso. Sempre tivemos uma essência muito boa, desde o início e conseguimos mantê-la até o fim. Brigas? Tivemos! Algumas ranhuras? Também. Contudo, com o passar do tempo, posso afirmar que essas coisas eram muito pequenas, perto da essência que carregamos por toda uma graduação.

Agradeço aos òtrapasö, por toda uma convivência, repleta de alegrias, boas risadas, companheirismo, ótimas histórias e uma amizade que certamente perdurará por toda uma vida!

Agradeço também, imensamente aos meus amigos de luta! Fomos vanguarda! Se não me falhe a memória, foram 57 dias. Dias de luta, dias de muito companheirismo, dias de um aprendizado sem igual... Afinal de contas, como gostávamos de dizer, òocupar é pedagógicoö (quem viveu sabe)! Na ocupação fiz novos amigos, reencontrei alguns outros, me permiti conhecer o que até então era um pouco òestranhoö e notei que de òestranhoö não tinha nada. Tudo isso com um sentimento de luta, revolta e vontade de gritar que o momento exigia. Porém, quando estive doente, meus amigos de luta me

deram um cobertor para me proteger do frio, quando estive com saudades, meus amigos de luta sempre vinham com boas conversas, quando estive triste, meus amigos de luta me abraçavam, então, certamente posso afirmar que esses 57 dias me proporcionaram ganhar grandes amigos. O Ocupa UAG foi sem sombra de dúvidas, minha maior escola dentro da Universidade, tenho muito orgulho em ter sido um ocupante!

Rafael Calumby: PRESENTE!

Então a todos, meus sinceros agradecimentos e meu fraterno abraço!

SUMÁRIO

RESUMO	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase).....	15
3.2 Gene 16S rRNA	16
3.3 Gene <i>nifH</i>	16
3.4 Gene <i>phoD</i>	17
3.5 Box-PCR	17
4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	19
5. DESENVOLVIMENTO	20
5.1 Extração de DNA genômico de bactérias.....	20
5.2 Eletroforese em gel de agarose	21
5.3 Amplificação do gene 16S rRNA.....	22
5.4 Amplificação do gene <i>nifH</i>	23
5.5 Amplificação do gene <i>phoD</i>	24
5.6 Amplificação e análise por BOX-PCR.....	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

O presente relatório refere-se ao Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), do curso de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco / Unidade Acadêmica de Garanhuns. O estágio foi realizado no Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura ãLuiz de Queirozõ, especificamente no Laboratório de Microbiologia do Solo, sob a supervisão do Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, no período de 23 de abril à 10 de Junho de 2018. Durante o estágio foram acompanhadas as atividades realizadas no cotidiano do laboratório, que desenvolve pesquisas com diversas metodologias aplicadas ao conhecimento da Microbiologia do Solo. Contudo, foi dado ênfase as técnicas da biologia molecular, como a Reação em Cadeia Polimerase com genes específicos, que apresentam relevância atual nos estudos em microbiologia do solo. O estágio proporcionou um maior conhecimento na área, a partir do contacto prático com essas técnicas.

1. INTRODUÇÃO

O estudo da diversidade microbiana é de fundamental importância para compreensão de um ecossistema, possuindo um importante papel nos mais variados ambientes. No solo, por exemplo, a microbiota é um fator determinante para a produtividade e estabilidade do sistema, estando associada com processos de ciclagem de nutrientes, degradação de matéria orgânica, produtividade primária, controle de patógenos, entre outros (DARDANELLI et al., 2010; TILMAN et al., 2014; FIERER, 2017; HU et al., 2018).

As bactérias são encontradas em associação com diferentes espécies de organismos, podendo formar associações benéficas com vegetais, muitas vezes, por uma relação simbiótica com estes, onde as bactérias agem colonizando a superfície radicular e/ou solo circundante (rizosfera), utilizando exsudados radiculares como fonte de energia ou colonizando partes internas da planta, sem causar danos ao hospedeiro (endofíticas) (ANDREOTE et al., 2009). Em ambos os casos, são diversos os efeitos benéficos, que as bactérias podem trazer de retorno para a planta, como a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, entre outros (QUECINE et al., 2012).

As plantas são um ecossistema para as diversas comunidades microbianas. Conhecer essa diversidade é de fundamental importância para entender os mecanismos que acontecem num cultivo agrícola. Por essa razão, faz-se necessário a aplicação de técnicas moleculares robustas que possam proporcionar melhores respostas a diversos questionamentos (WONG-VILLARREAL et al., 2012). A partir disso, avanços no uso de técnicas moleculares vêm demonstrando uma enorme diversidade de microrganismos, algo que antes era impossível, com técnicas tradicionais de isolamento (HUGHES et al., 2001).

Métodos independentes de cultivo foram desenvolvidos e usualmente são usados para examinar a ecologia das comunidades microbianas (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011). A utilização dessas técnicas possibilita o desenvolvimento de pesquisas, de maneira muito mais efetiva, com custos e tempo consideravelmente reduzidos, junto a uma grande capacidade de produção de dados (ARMOUGOM; RAOULT, 2009).

A utilização dessas técnicas a partir de métodos independentes de cultivo, inicia-se basicamente, por meio da extração de DNA de uma determinada amostra

ambiental. Posterior a isso, desenvolve-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual se utiliza de *primers* específicos, como por exemplo os que acessam regiões variáveis em genes ribossomais do genoma bacteriano (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011).

Diante do exposto, o objetivo do Estágio Supervisionado Obrigatório foi realizar atividades que proporcionassem um maior conhecimento em biologia molecular, seja pelo contato prático com algumas técnicas moleculares, seja pelo conhecimento teórico das mesmas.

2. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) é um Campus da Universidade de São Paulo (USP) voltada ao ensino, pesquisa e extensão universitária nas áreas das Ciências Agrárias, Sociais Aplicadas e Ambientais. A ESALQ está localizada em Piracicaba, no estado de São Paulo, a 160 km da capital, e ocupa uma área de 3.825,4 hectares, denominada Campus "Luiz de Queiroz" (Figura 1), correspondente a 49% da área total da USP e ainda possui 4 estações experimentais.

A instituição iniciou suas atividades em 1901, inicialmente com o nome de Escola Agrícola Prática de Piraciaba, como resultado da doação e idealização do Engenheiro Agrônomo Luiz Vicente de Souza Queiroz. Atualmente, considerada um centro de excelência, oferece sete cursos de graduação e 15 programas de pós-graduação (PPG), além de duas interunidades e uma interinstitucional, que se utilizam de seus 12 departamentos.

O Departamento de Ciência do Solo atua nas áreas de solos, adubação, nutrição mineral de plantas e microbiologia do solo. O presente estágio, foi realizado no laboratório de Microbiologia do Solo que dentre outras atividades, realiza pesquisas em análises microbiológicas, diversidade microbiana de ecossistemas naturais e agrícolas, entre outros.



Figura 1: Imagem aérea da ESALQ/USP

Fonte: Google maps (2018)

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A PCR é uma técnica rotineira de biologia molecular, que consiste em uma metodologia *in vitro* que possibilita a reprodução de milhares de cópias de um determinado fragmento de DNA. O advento aconteceu em 1987 pelo pesquisador Kary Mullis, sendo considerado um dos maiores passos das Ciências Biológicas durante o Século XX, sendo Kary Mullis agraciado com o prêmio Nobel em 1994 (MICKLOS et al., 2005). A técnica desenvolvida por Mullis desenvolveu um mecanismo que permitiu obter cópias de segmentos específicos, devido a a introdução do conceito de *primer* de PCR e na utilização de uma DNA polimerase termoestável, a denominada Taq-polimerase, que é uma enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, que tem o diferencial de manter-se estável em temperaturas de até 117 °C, tendo como temperatura ótima de 72 °C. Os *primers* utilizados, são oligonucleotídeos, geralmente com 20 pares de bases, que são sintetizados *in vitro*. Estes *primers* se complementam às extremidades da região de DNA que se pretende amplificar, sendo utilizados como fita molde o DNA fita simple gerado pelo aquecimento do DNA do genoma inteiro (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2003).

A reação de PCR tem início a partir de um DNA molde, extraído da amostra a ser analisada e do mix com todos os componentes necessários para que a reação aconteça (Taq polimerase, nucleotídeos, *primers* e cofator enzimático). Em seguida, as amostras são colocadas no termociclador, que é um equipamento que permitiu maior agilidade e eficiência a técnica, proporcionando de maneira mais eficaz as etapas básicas para reação em cadeia da polimerase, sendo repetida em vários ciclos com precisão. Tais etapas são a desnaturação, o anelamento e a extensão, cada uma com temperaturas específicas (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011).

A PCR permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes, onde cada ciclo duplica a quantidade de DNA do ciclo anterior, tendo assim, um crescimento exponencial. Após cada ciclo da síntese de DNA, os fragmentos novos gerados servirão como molde e dentro de poucos ciclos o produto predominante é uma única espécie de fragmento de DNA, que por sua vez, terá um comprimento correspondente a distância entre os dois iniciadores originais. Aproximadamente 20 a 30 ciclos de reação são suficientes para a amplificação efetiva

do DNA. Estima-se que ao final dos 30 ciclos de amplificação, existem cerca de um milhão de moléculas do DNA de interesse para cada molécula molde da amostra inicial, o que possibilita estudos seguros em biologia molecular (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2003).

3.2 Gene 16S rRNA

Os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) são os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade e filogenia, pelo fato de seus genes serem universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, e a sequência de DNA correspondente com o alto grau de conservação. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões do gene (LANE et al., 1985). As análises da sequência do 16S rDNA, são de extrema importância para a biologia molecular, foram delas as primeiras aplicações de técnicas baseadas em ácidos nucleicos no estudo de ecologia microbiana e relações filogenéticas entre microrganismos (Macrae, 2000).

As técnicas com o uso do gene 16S do RNA ribossômico proporcionaram um grande avanço em análises de estrutura de comunidades bacterianas, sendo amplamente utilizadas, pelo fato do gene estar presente em todas as bactérias, derivar de um ancestral comum, apresentar um tamanho suficiente para análises filogenéticas, além de ser geneticamente estável. Diante disto, o sequenciamento deste gene tende a permitir a identificação de microrganismos não só ao nível de gênero, como possivelmente também, ao nível de espécie (CHENEBY et al., 2000).

3.3 Gene *nifH*

A fixação biológica de nitrogênio é uma característica bastante significativa entre alguns grupos de microrganismos. Tal capacidade ocorre devido a ação do complexo enzimático da nitrogenase. Esta enzima está sujeita a controles reguladores rigorosos, sendo inibida pelo O₂ e por formas fixas de nitrogênio, incluindo NH₃, NO₃ e certos aminoácidos. A maior parte dessa regulação ocorre na expressão dos genes estruturais *nif* (SOMVANSHI et al 2016).

O gene *nifH* codifica a dinitrogenase-redutase, que é componente da nitrogenase, e é utilizado como medida de diversidade das bactérias diazotróficas, este vêm sendo amplamente utilizado em estudos filogenéticos, sendo um dos genes que também codificam a produção da proteína FeMo, componente fundamental da enzima

nitrogenase. Estudos com este gene estão voltados para comparação de bactérias diazotróficas. Este gene apresenta uma seqüência de bases bastante conservada, o que permite sua utilização nos estudos de diversidade destas bactérias (ROSADO et al., 1999).

3.4 Gene *phoC* e Gene *phoD*

Os microrganismos são componentes integrais no ciclo do fósforo (P) e, por meio de mecanismos de solubilização e mineralização, são capazes de converter o P orgânico e inorgânico, na forma biodisponível, facilitando a absorção pelas raízes das plantas (KHAN et al., 2009).

As bactérias são os microrganismos solubilizadores de fosfato que geralmente se encontram em maior número no solo. O mecanismo de mineralização mais utilizado é a produção e secreção de enzimas, como as nucleases, fosfolipases e as mais abundantes e estudadas fosfatases (NANNIPIERI et al., 2011). Dependendo de seu pH ótimo, essas enzimas são divididas em fosfatases ácidas e alcalinas, onde ambas podem ser produzidas por microrganismos (JORQUERA et al., 2008).

O gene *phoC* codifica componentes da fosfatase ácida e o gene *phoD* codifica componentes da fosfatase alcalina, estando eles, presentes nos microrganismos solubilizadores de fosfato, tendo sua ação ativada conforme as condições do pH no meio. São ambos bem representativos na microbiota presente no solo. A particularidade das diferentes fosfatases é que as plantas, mesmo que possivelmente com uma significância menor, podem produzir fosfatases ácidas, em contrapartida, acredita-se que a atividade da fosfatase alcalina nos solos, parece estar totalmente atribuída aos microrganismos (CRIQUET et al., 2004).

3.5 Box-PCR

A análise genética por meio de PCR utilizando *primers* específicos desempenha um importante papel nos estudos de diversidade genética. Os avanços da técnica demonstraram que existem seqüências repetitivas intergênicas, dispersas no genoma bacteriano, conhecidas como Box-PCR: REP, ERIC e BOX. Tais seqüências geram padrões fortemente característicos quando separados em gel de agarose podendo ser usados como uma ferramenta taxonômica (DE BRUUN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994).

As sequências BOX possuem aproximadamente 154 pares de base, parecendo estar envolvidas na duplicação do DNA. Sua ação seria com a DNA girase e terminação da transcrição (MEHTA, 2000). O BOX-PCR destingue em relação as suas técnicas semelhantes, por os padrões de amplificação serem considerados menos complexos que os obtidos com REP/ERIC, entretanto permite uma boa discriminação ao nível de estirpe (OLIVE & BEAN, 1999).

A BOX-PCR é mais umas das variações que tem como princípio os conceitos básicos da PCR, sendo uma técnica que se utiliza de apenas um *primer*, com uma sequência conhecida, tendo como resultado, a obtenção de vários padrões de bandas e de "fingerprints" genômicos de indivíduos, variedades e populações. Com isso, o BOX-PCR, é uma técnica altamente usada nos estudos de biologia molecular, pois a análise dos seus produtos permite determinar as relações filogenéticas entre diferentes espécies. (ARMSTRONG, 2007).

Os avanços em técnicas de biologia molecular, vêm proporcionando um estudo mais eficiente na diversidade microbiana do solo, sendo cada vez mais de interesse o conhecimento desta diversidade, nos mais diferentes solos, tendo em vista que estes microrganismos apresentam papel crucial na regulação e funcionamento de um ecossistema. Como se sabe, a microbiota do solo é fundamental na ciclagem de nutrientes, na disponibilização de substâncias promotoras de crescimento para as plantas, entre outros valores biotecnológicos e econômicos, podendo inclusive, disponibilizar uma grande fonte de produtos farmacêuticos, corantes, enzimas, ácidos orgânicos e muitos outros recursos ainda inexplorados. Várias metodologias são propostas para estudos que envolvem a ecologia microbiana do solo. A diversidade biológica é geralmente utilizada como índice que reflete a qualidade do ecossistema, de modo que as metodologias que possibilitam o estudo da diversidade microbiana também possam indicar diferenças entre solos tanto com respeito as suas populações quanto a suas funções.

4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O plano de atividades foi elaborado visando acompanhar as atividades realizadas na rotina do Laboratório de Microbiologia do Solo, com ênfase no acompanhamento de técnicas de biologia molecular.

As atividades executadas estão listadas abaixo:

- Extração de DNA em amostras de isolados bacterianos;
- Amplificação dos genes 16S rRNA, Gene *nifH*, Gene *phoD*
- Amplificação e análise por BOX-PCR
- Eletroforese em gel de agarose;
- Escrita do relatório.

5. DESENVOLVIMENTO

5.1 Extração de DNA genômico de bactérias

Vários tipos de amostras biológicas podem ter seu material genético extraído, desde que sigam os procedimentos corretos. No caso de um isolado bacteriano, os procedimentos foram os seguintes: As bactérias foram cultivadas em 5 mL de TSA 10% líquido por 24 h a 28° C sob agitação de 150 rpm. Dois mililitros da cultura foram centrifugados por 5 min a 14000 g e as células ressuspensas em 500 μ L de TE (10 mM de Tris- HCl; pH 8,0), centrifugadas e ressuspensas novamente em 500 μ L de TE com o acréscimo de 0,5 g de pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro ó Sigma) e 15 μ L de SDS 20%. As células foram agitadas em um homogeneizador (Mine- Beadbeater TM , Biospec Products) por 30 s a 3500 bpm. Ao lisado celular foram adicionados 500 μ L de fenol, homogeneizados por inversão e centrifugado por 5 min a 14000 g. A fase aquosa foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio (1:1) e uma vez com clorofórmio, então, o DNA foi precipitado com 1/10 volume de NaCl 5M e 0,6 volume de isopropanol (3 min à temperatura ambiente) e coletado por centrifugação (10 min a 14000 g). O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 37 ° C e ressuspendido em 50 μ L de água ultrapura esterilizada (Figura 2) (Sambrook et al. 1989).

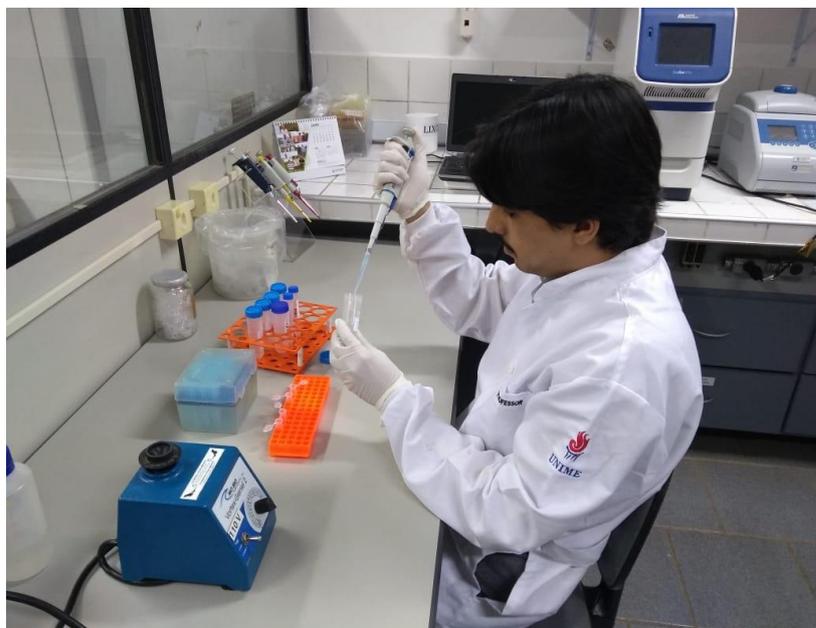


Figura 2: Extração de DNA genômico de bactérias

Fonte: Arquivo pessoal (2018)

5.2 Eletroforese em gel de agarose

Após uma extração de DNA, segundo Sambrook et al. (1989), o material deve ser analisado por eletroforese em gel de agarose (0,8% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). No procedimento, utiliza-se 3µL da amostra de DNA;homogeiniza-se com 1µL de tampão de corrida 5X (Loading Buffer). Aplica-se as amostras nos poços; Reservar-se geralmente 2 poços para utilização de um padrão de corrida (Ladder-1Kb); Ajusta-se a voltagem da cuba de eletroforese de acordo com o tempo de corrida desejado (média utilizada 80V); Analisa-se o gel sob radiação ultravioleta (figura 3).

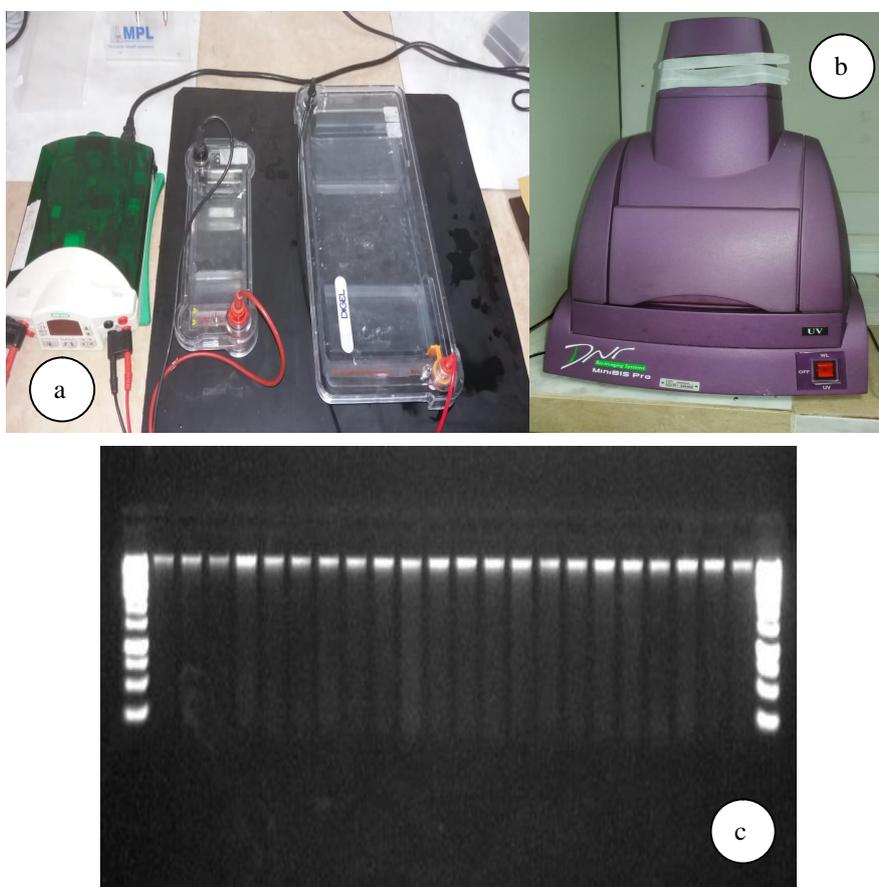


Figura 3: A figura 3a demonstra uma cuba de eletroforese; a figura 3b, demonstra um transiluminador UV; a figura 3c, demonstra fragmentos de DNA em gel de agarose visualizados pela eletroforese.

Fonte: Arquivo pessoal (2018)

5.3 Amplificação do gene 16S rRNA

A amplificação do 16S rRNA foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos universais para o domínio bactéria P027F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1378R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3'). As reações apresentaram um volume final de 50 μ L contendo 0,5 a 10ng de DNA molde; 0,2M de cada oligonucleotídeo, 0,2mM de cada dNTP; 3,75mM de MgCl₂ e 0,05 U da enzima Taq DNA polimerase em 20mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50mM KCl. Em todas as reações foram utilizados controles negativos sem o DNA molde.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Applied Biosystems* programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 4min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30s, anelamento a 63 °C por 1min e extensão de oligonucleotídeos a 72 °C por 1min, seguida de extensão final a 72 °C por 7min. Após a amplificação, 5 μ L da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v) a 3 volts/cm em tampão TAE 1x e corado com brometo de etídio (1,0 mg/mL), para visualização de um fragmento de aproximadamente 1350pb juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 1000pb (Figura 4).

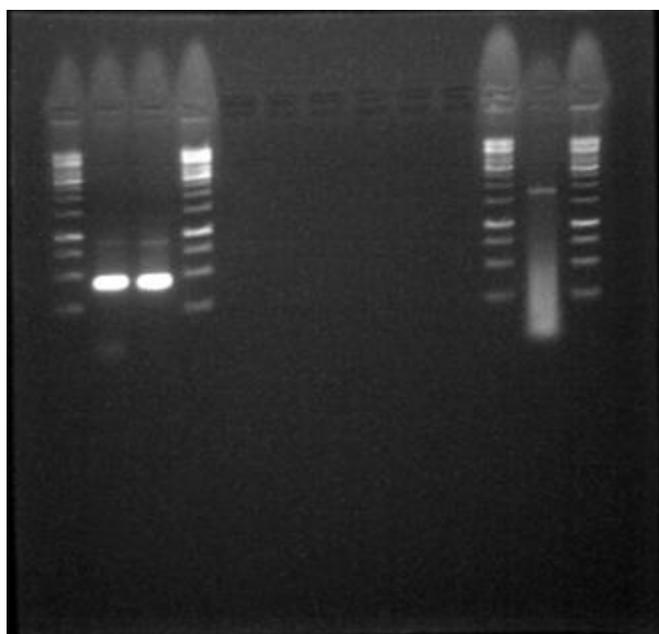


Figura 4: Fragmentos do gene 16S rRNA amplificado

Fonte: Arquivo pessoal (2018)

5.4 Amplificação do gene *nifH*

A presença do gene que codifica a subunidade Fe da enzima nitrogenase (*nifH*) foi avaliada por meio da técnica de PCR com a utilização dos *primers* específicos 19F (5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3') e 407R (5'-AAICCRCCRCAIACIACRTC-3'). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ l, contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde; 1 μ M de cada *primer*; 0,2 mM de cada dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂ e 0,05 U da enzima Taq DNA polimerase em 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl (UEDA et al., 1995).

A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Perkin-Elmer GeneAmp[®] PCR System 9700* programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 59 °C por 1 min e extensão de *primers* a 72 °C por 30 s, seguida de extensão final a 72 °C por 7 min. Após a amplificação, 10 μ l da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v) em tampão 1 x TAE e corado com brometo de etídio (0,5 μ g/ml), para visualização de um fragmento de 300 a 400 pb (Figura 5) (SAMBROOK et al., 1989).

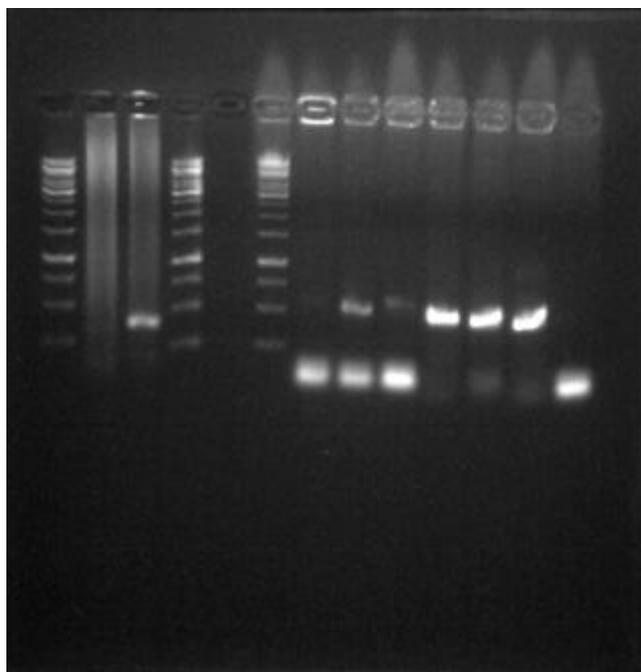


Figura 5: Fragmento do gene *nifH* amplificado

Fonte: Arquivo pessoal (2018)

5.5 Amplificação dos genes *phoC* e *phoD*

Para amplificação do gene *phoC* foi utilizado o iniciador específico para o gene *phoC* (SCF43A por PCR com o par de iniciadores F2 TAATAAGCTTCACCGCTGCCGTCGTA e R2 TGGGATCCATCTGGTGTCCCTCTCGTA).

Para amplificação do gene *phoD*, foi utilizado o iniciador específico para o gene *phoD* (ALPS-F730 CAGTGGGACGACCACGAGGT; ALPS-R1101 GAGGCCGATCGGCATGTCG) (SAKURAI et al., 2008).

As reações de PCR foram realizada com 1 μL de DNA total, 3,0 μL de PCR tampão 1X, 3,0 μL de MgCl_2 (50mM), 2,0 de dNTP (2,5 mM), 0,2 μL de cada iniciador e 0,5 μL de Taq DNA polimerase (5 U μL^{-1}); o volume final foi ajustado com água deionizada esterilizada para 20 μL .

Para o Gene *phoC*, as condições de amplificação foram uma desnaturação inicial a 93 °C durante 3 minutos, seguidos de 45 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 20 segundos e extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Após a amplificação, a reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Figura 6).

As condições de amplificação foram uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 57°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos e extensão final a 72°C durante 7 minutos. Após a amplificação, a reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Figura 6) (SAKURAI et al., 2008).

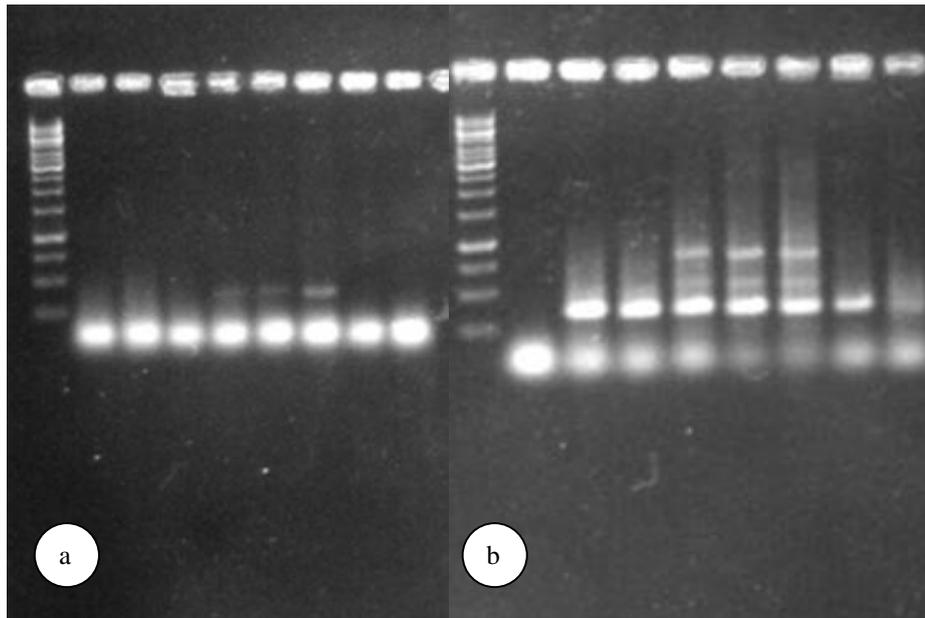


Figura6: A figura 6a condiz ao gel do gene *phoC*, o qual suas amostras não amplificaram o gene. A figura 6b, demonstra o fragmento do gene *phoD* amplificado.

Fonte: Arquivo pessoal (2018)

5.6 Amplificação e análise por BOX-PCR

A análise dos isolados por BOX-PCR foi realizada utilizando-se do *primer* BOX-1AR. Alíquotas de 12 L do produto de PCR foram carregadas em gel de agarose 1,5% (p/v) de 20 cm em 1 x TAE, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 1kb (Invitrogen), e corrida a 40 V por 16 horas. O gel foi corado com brometo de etídio, sobre luz ultravioleta e fotodocumentado. As imagens dos géis foram analisadas com o programa Gel ComparII (Figura 7).

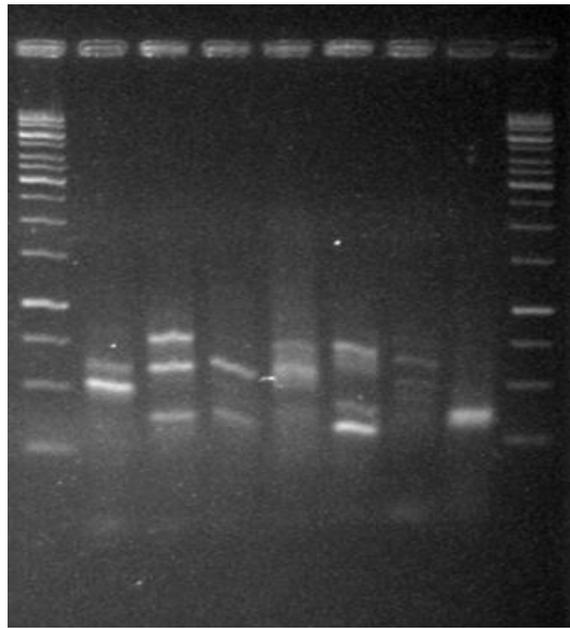


Figura 7: Amplificação por BOX-PCR

Fonte: Arquivo pessoal (2018)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do ESO no laboratório de Microbiologia do Solo, na ESALQ/USP, proporcionou a vivência com técnicas atuais de biologia molecular, aplicadas no estudo da microbiologia, inclusive de alto interesse agrícola, permitindo um significativo ganho de experiência. O conhecimento prático e teórico adquirido nesse período foram de fundamental importância para a complementação e conclusão da formação acadêmica, possibilitando a aquisição de novos conhecimentos em técnicas de vanguarda da biologia molecular aplicada à agricultura.

A oportunidade do estágio proporcionou um importante crescimento profissional, contribuindo com as perspectivas futuras do estagiário em seu interesse de dar continuidade à carreira científica.

7. REFERÊNCIAS

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417-432, 2009.

ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high throughput methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, Los Angeles, v. 2, p. 69-92, 2009.

ARMSTRONG, L. C. T. **Estudo da Variabilidade Genética de Rizóbios Isolados de Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.) de Dois Centros de Origem Por Meio de BOX-PCR**. Dissertação (Dissertação em Ciências Biológicas) ó UFPR. Curitiba, p. 31. 2007.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

CRICQUET, S.; FERRE, E.; FARNER, E.M.; LE PETIT, J. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: Influence of biotic and abiotic factors. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1111-1118, 2004.

DARDANELLI, M.S.; MANYANI, H.; GONZALEZ-BARROSO, S.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, M.A.; GIL-SERRANO, A.M.; ESPUNY, M.R.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; BELLOGÍN, R.A.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F.J. Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. **Plant Soil**, v. 328, p. 483-493, 2010.

DE BRUIJN, F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soils bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 58, p. 2180-2187, 1992.

FIERER, N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 579-590, 2017.

HU, Y.; DOU, X.; LI, J.; LI, F. Impervious surfaces alter soil bacterial communities in urban areas: A case study in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-9, 2018.

HUGHES, J.B.; HELLMAN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

JORQUERA, M.A.; HERNANDEZ, M.T.; RENGEL, Z.; MARSCHNER, P.; MORA, M.D. Isolation of culturable phosphorus bacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 1025-1034, 2008.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. In: LICHTFOUSE, E.; NAVARRETE, M.; DEBAEKE, P.; VÉRONIQUE, S.; ALBEROLA, C. eds., **Sustainable Agriculture**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 551-570, 2009.

LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 77-82, 2000.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M.R. DOS S. **Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos**, In; Matioli, S.R. *Biplogia molecular e evolução*,. Ed. Holos, 2003.

MEHTA, A. **Diversidade genética em linhagens de *Xyllela fastidiosa* isoladas de citro.** Campinas, 2000, 103 f, (Dissertação, de. Mestrado), IB/Unicamp, Universidade de. Campinas.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. **A ciência do DNA. 2º edição.** ARTMELD: Porto Alegre, 2005.

NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: BÜNEMANN, E.; OBERSON, A.; FROSSARD, E., eds. **Phosphorus in action: Biological processes in soil phosphorus cycling.** Springer, Berlin, p. 215-243, 2011.

OLIVE, D.M., BEAN, P. Minireview: principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 37, p. 1661-1669, 1999.

QUECINE, M. C.; ARAÚJO, W. L.; ROSSETOO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P. T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 7511-7518, 2012.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; De BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A.D.L.; van ELSAS, J.D., and de BRUIJN, F.J. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 1-27.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; MENDONÇA-HAGLER. L.C. **A moderna microbiologia do solo: aplicação de técnicas de biologia molecular.** In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FANQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). **Inter-relação: fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 429-448.**

SAKURAI, M.; WASAKI, J.; TOMIZAWA, Y.; SHINANO, T.; OSAKI, M. Analysis of bacterial communities on Alkaline phosphatase in soil supplied with organic matter. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, p. 62-71, 2008.

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

SOMVANSHI, V.S., et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Rtméd, 2016. ISBN 978-85-8271-298-6.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.

TILMAN, D.; ISBELL, F.; COWLES, J.M. Biodiversity and Ecosystem Functioning. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 45, p. 471-493, 2014.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.1414-1417, 1995.

VAN ELSAS, J.D.; BOERSMA, F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, Oxford, v. 47, p. 77-87, 2011.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, MŠ DE BRUIJN, F., LUPSKI, J.R. Genomic fingerprint. of bacteria, using repetitive. sequence-based. polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, n. 5, p. 25-40, 1994.

WONG-VILLARREAL, A.; VELAZQUEZ-MÉNDEZ, A. M.; ROSADO-ZARRABAL, T. L.; VITE-VALLEJO, O.; CABALLERO-MELLADO, J. Low diversity diazotrophic of culturable Burkholderia species associated with sorghum. **African Journal of Microbiology Research, Ebene**, v. 6, p. 3058-3064, 2012.

