

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

## **Molecular monitoring of bacterial community during bioremediation of contaminated soils**

**Sandy Sampaio Videira**

Bolsista PCI, Eng. Agrônomo, D.Sc.

**Claudia Duarte da Cunha**

Supervisora, Eng. Química, D. Sc.

### **Resumo**

Avaliar a distribuição das sequências do gene 16S rRNA em uma amostra ambiental é fundamental para determinar a composição da microbiota dos solos. No entanto, uma representação mais precisa da comunidade bacteriana pode ser fortemente influenciada pelos protocolos para a extração de DNA bem como pela escolha dos iniciadores usados nas reações de amplificação. Neste estudo, exploramos sistematicamente o impacto de diferentes kits comerciais de extração de DNA, escolha dos iniciadores e condições de PCR especificamente projetados para as tecnologias de sequenciamento pelo Ion Torrent PGM e DGGE com base nas regiões V3 e V6 do gene 16S rRNA. As amostras utilizadas neste trabalho são de um solo multi-contaminado com diferentes concentrações de níquel e óleo combustível, antes e após o processo de biorremediação. Em geral, as metodologias de extração de DNA apresentaram diferenças na eficiência de obtenção de DNA de qualidade, que influenciaram diretamente as etapas de amplificação do gene de interesse. A escolha dos iniciadores e as condições de PCR também mostraram efeito quanto aos produtos gerados. Para as análises do gene 16S rRNA, nas condições testadas, os melhores resultados foram obtidos com o kit de extração DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit e os iniciadores para a região V3 do gene 16S rRNA, tanto para os protocolos de Ion Torrent quanto para DGGE.

**Palavras chave:** hidrocarboneto, níquel, DNA, sequenciamento de nova geração, DGGE.

### **Abstract**

Assessing the distribution of 16S rRNA gene sequence within an environmental sample is fundamental to determine soil microbiota composition. However, the precise representation of this bacterial community may be affected by the protocols used for DNA extraction as well as by the PCR primers employed in the amplification reaction. In this study we systematically explored the impact of different commercial kits for DNA extraction, primer choice and PCR settings for the Ion Torrent PGM and DGGE technologies based on the V3 and V6 regions of 16S rRNA gene. The samples used in this study are soil artificially contaminated with different concentrations of nickel and oil, before and after the bioremediation process. In general, DNA extraction showed differences in DNA quality obtained, influencing directly the amplification steps of the gene of interest. The primers choice and PCR conditions also affected the products obtained. For 16S rRNA gene analysis in soils, under the tested conditions, the best results were obtained using DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit and primer for V3 region of 16S rDNA, for Ion Torrent protocol as well as DGGE.

**Key words:** hydrocarbon, nickel, DNA, new generation sequencing, DGGE.

## 1. Introdução

Métodos independentes de cultivo tem revolucionado nosso entendimento sobre a microbiologia de comunidades de ambientes naturais ou sob influências antropogênicas. Os métodos de análises filogenéticas baseados em DNA vêm sendo cada vez mais aplicados, devido principalmente à diminuição exponencial dos custos de análise e do grande volume de dados que os mesmos são capazes de gerar (CAPORASO *et al.*, 2012). No entanto, nestes tipos de análises, só é possível conhecer o que é possível sequenciar e só é possível sequenciar aquilo que é possível extrair e amplificar (ALBERTSEN *et al.*, 2015). Diante destes fatos, a seleção dos protocolos de extração e amplificação do DNA é fundamental para o resultado mais preciso sobre a composição, diversidade e riqueza das comunidades microbianas em amostras ambientais.

A fim de alcançar resultados precisos sobre a microbiota dos ambientes, muitos fatores têm sido considerados incluindo o tipo de amostra, estocagem das amostras antes da extração do DNA, os procedimentos de extração de DNA, as sequências dos iniciadores e até as plataformas de sequenciamento (TREMBLAY *et al.*, 2015). Depois do método de extração de DNA, uma das etapas mais críticas para a acurácia de amplificação dos genes de interesse é escolha dos iniciadores, já que o uso de iniciadores inadequados pode levar a sub-representação de grupos bacterianos, gerando conclusões biológicas questionáveis (KLINDWORTH *et al.*, 2013). Para a diversidade bacteriana são utilizados iniciadores para diferentes regiões do gene 16S rRNA, que permitem a classificação taxonômica a nível de espécie (LUNDBERG *et al.*, 2013). Este gene é subdividido em 9 regiões distintas com alta variabilidade genética, V1-V9; as quais estão diretamente relacionadas a taxonomia microbiana. Há algumas décadas os trabalhos consideravam a região V6 como a mais promissora para as análises de diversidade, mas, recentemente, os estudos mostram que as regiões V3 e V4 são mais representativas para amostras ambientais (WALTERS *et al.*, 2016).

Embora a escolha do iniciador seja crucial para minimizar a introdução de erros, os parâmetros utilizados nos protocolos de amplificação por PCR também influenciam no resultado (KENNEDY *et al.*, 2014). Reações não otimizadas podem amplificar fragmentos não específicos, como cloroplastos e mitocôndrias, no caso das plantas, gerando informações equivocadas da estrutura e composição da microbiota dos ambientes (THIJS *et al.*, 2017). Por isso, a análise comparativa dos resultados deve ser feita de maneira cuidadosa em termos de cobertura taxonômica e amplificação não específica, a fim de aumentar a eficiência das análises moleculares e ampliar o volume de informações de qualidade sobre as comunidades microbianas.

Essas premissas reforçam a necessidade de estabelecimento de protocolos confiáveis para investigar a composição do microbioma dos solos. Aqui, descrevemos os procedimentos preliminares especificamente projetados para as tecnologias de DGGE e Ion Torrent PGM com base nas regiões V3 e V6 do gene 16S rRNA e amostras de solo multi-contaminado com metal pesado e óleo combustível. O DGGE é uma técnica rápida, sensível e, conseqüentemente, promissora para distinguir a diversidade de diferentes

grupos filogenéticos com atividades específicas no processo de biorremediação (MEEBOON *et al.*, 2016), no entanto dentre suas limitações está a identificação taxonômica dos micro-organismos. Para este fim, o sequenciamento de DNA é a metodologia mais utilizada. Atualmente, com o avanço das tecnologias e consequente redução dos custos, estas análises têm sido realizadas pelo sequenciamento de nova geração (SNG), que é capaz de “ler” até bilhões de fragmentos de DNA ao mesmo tempo, permitindo a geração mais rápida e completa de perfis genômicos de amostras ambientais. Na área da biorremediação, as pesquisas microbianas e ambientais estão mais direcionadas a aplicação desta técnica (MORAES *et al.*, 2016;THIJS *et al.*, 2017), a fim de identificar os micro-organismos, bem como seus genes funcionais, associados a altas taxas de degradação de contaminantes. As informações geradas podem ser utilizadas como indicadores do potencial dos solos para a biorremediação, além de identificar organismos potenciais para a aplicação no processo de biorremediação.

## **2. Objetivos**

O objetivo deste estudo é produzir um protocolo confiável, para DGGE e Ion Torrent PGM, a fim de investigar, em análises futuras, as mudanças estruturais e de diversidade genética ocorridas em comunidades microbianas de solos multi-contaminados submetidos ao processo de biorremediação.

## **3. Material e Métodos**

### **Amostras**

Para o estabelecimento dos protocolos foram utilizadas amostras de terra do horizonte B de um Chernossolo localizado na região de Vila Kennedy, no município de Bangu, RJ. As amostras foram contaminadas artificialmente e utilizadas para ensaios de biorremediação variando os teores de umidade (30 e 50% da CRA), concentração de níquel (130 e 260 mg/Kg) e óleo combustível (1 e 5%) (Tabela 1). Estes ensaios foram conduzidos em microcosmos por um período de 42 dias. Amostras de 5 gramas de cada tratamento foram retiradas no tempo inicial (0h) e final (42 dias) e armazenadas individualmente em tubos tipo Falcon sob temperatura de -20°C para as análises moleculares.

### **Extração de DNA**

Para a identificação do melhor método de extração de DNA das amostras foram utilizados 4 kits de extração comerciais: (i) FastDNA® Spin (MP Biomedicals), utilizado por grande parte dos artigos disponíveis na literatura; (ii) PowerSoil® DNA Isolation (MoBio), recomendado pelo Earth Microbiome Project (EMP) (<http://www.earthmicrobiome.org/>), (iii) DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen), kit de nova geração com tecnologia de remoção de inibidores presentes em solos e (iv) ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (ZymoResearch), desenvolvido para análises de microbioma e metagenômica. Todos os protocolos foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. Para comparação inicial, foram utilizadas quatro amostras representativas: solo virgem, 1 amostra multi-contaminada no tempo 0h (PC2\_0h) e 2 amostras multi-contaminadas no tempo 42 dias (1/130/10\_42d\_A e 5/260/10\_42d\_A).

**Tabela 1.** Descrição dos tratamentos utilizados neste estudo.

Identificação da amostra	Descrição dos tratamento				
	Óleo (%)	[ ] níquel (mg)	Umidade (%)	Tempo (Dias)	Ensaio
1. Virgem*	-	-	-	0	-
2. Níquel 130 mg	-	130	-	0	-
3. Níquel 260 mg	-	260	-	0	-
4. Óleo 1%	1	-	-	0	-
5. Óleo 5%	5	-	-	0	-
6. PC2_0h*	2,5	195	40	0	-
7. 1/130/10_0h	1	130	30	0	-
8. 5/260/20_0h	5	260	50	0	-
9. PC2_42d_A	2,5	195	40	42	A
10. 1/130/10_42d_A*	1	130	30	42	A
11. 1/130/20_42d_A	1	130	50	42	A
12. 1/260/10_42d_A	1	260	30	42	A
13. 1/260/20_42d_A	1	260	50	42	A
14. 5/130/10_42d_A	5	130	30	42	A
15. 5/130/20_42d_A	5	130	50	42	A
16. 5/260/20_42d_A	5	260	30	42	A
17. 5/260/10_42d_A*	5	260	50	42	A
18. PC2_42d_B	2,5	195	40	42	B
19. 1/130/10_42d_B	1	130	30	42	B
20. 1/130/20_42d_B	1	130	50	42	B
21. 1/260/10_42d_B	1	260	30	42	B
22. 1/260/20_42d_B	1	260	50	42	B
23. 5/130/10_42d_B	5	130	30	42	B
24. 5/130/20_42d_B	5	130	50	42	B
25. 5/260/10_42d_B	5	260	30	42	B
26. 5/260/20_42d_B	5	260	50	42	B

\*Amostras utilizadas para os ensaios preliminares de extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA.

### Amplificação do gene 16S rRNA

Sequências parciais do gene 16S rRNA foram amplificadas usando iniciadores específicos para as regiões hipervariáveis V6 e V3 do gene em questão. A lista completa dos iniciadores utilizados neste estudo está reportada na tabela 2. Para explorar o efeito das condições de PCR, foram variadas as quantidades de MgCl<sub>2</sub> e DNA, acréscimo de BSA e Formamida, o número de ciclos e a temperatura de anelamento. Para comparação inicial, foram utilizadas quatro amostras representativas: solo virgem, 1 amostra multi-contaminada no tempo 0h (PC2\_0h) e 2 amostras multi-contaminadas no tempo 42 dias (1/130/10\_42d\_A e 5/260/10\_42d\_A).

Ao final de inúmeros testes para as reações de PCR, as amplificações das regiões V3 e V6 do gene 16S rRNA otimizadas para análise de sequenciamento (Ion Torrent PGM) foram realizadas num volume final de 50 µL contendo a mistura de 5,0 µL de tampão 10 x, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 1,0 µL BSA (20 mg.mL<sup>-1</sup>), 1,0 µL de cada iniciador (10 µM), 0,5 µL Taq DNA polimerase (5U.µl<sup>-1</sup>) (Invitrogen) e, aproximadamente, 25 ng de DNA. As condições de PCR usadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguida de 30 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.. Para as análises de DGGE, as reações otimizadas foram semelhantes às desenvolvidas para o sequenciamento, com exceção para a temperatura de anelamento e extensão que passaram de 50°C por 45 seg. e 72°C por 45 seg para 50°C por 1 min. e 72°C por 1 min.. Todas as amplificações foram conduzidas em um termociclador Verity (ThermoFisher) e os produtos da reação foram verificados em eletroforese em gel de agarose 1%.

**Tabela 2.** Iniciadores usados neste estudo.

Nome do Oligonucleotídeo	Sequência do Adaptador/Grampo	key+ Barcode	Sequencia do Oligonucleotídeo	Região do 16S rRNA	Referência
<b>Ion Torrent PGM</b>					
806R	CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG AT		GACTACHVGGGTWTCTAAT	V3	Caporaso et al., 2012
515F	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC	TCAG+BC	GTGCCAGCMGCCGCGTAA	V3	Caporaso et al., 2012
1193R	CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG AT		GAA GGY GGG GAY GAC G	V6	Bodenhausen et al., 2013
967F	CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC	TCAG+BC	CAACGCGAAGAACCTTACC	V6	Sogin et al., 2006
<b>DGGE</b>					
P2R			TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC	V3	Muyzer et al. 1993
P3_P1 <sup>AGC</sup>	CGC CCGCCGGCC CCC GCGCCC GTC CCGCCGCC CCGCC		GGA ATC TTC CAC AAT GGG CG	V3	Muyzer et al. 1993
968F <sup>AGC</sup>	CGC CCGCCGGCC CCC GCGCCC GTC CCGCCGCC CCGCC		AAC GCG AAG AAC CTT AC	V6	Nübel et al., 1996
1378R			CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	V6	Heuer et al., 1997

## 4. Resultados e Discussão

### Extração de DNA

Amostras de solo de 4 tratamentos distintos foram utilizadas para extração de DNA com 4 diferentes kits comerciais. O kit FastDNA® Spin não mostrou resultado satisfatório quanto a qualidade e quantidade de DNA extraído. Os kits PowerSoil® DNA Isolation e ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit apresentaram qualidade e quantidade de DNA superior ao kit FastDNA® Spin, mas o rendimento das reações não foi tão bom quanto os observados pelo kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit. Este kit apresentou melhor qualidade e quantidade de DNA obtido, o que interferiu positivamente nos resultado de amplificação do gene 16S rRNA com os iniciadores utilizados neste estudo. Após obtenção destes resultados, todas as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit supracitado. A concentração de DNA média obtida variou de 2,3 a 15 ng/μl.

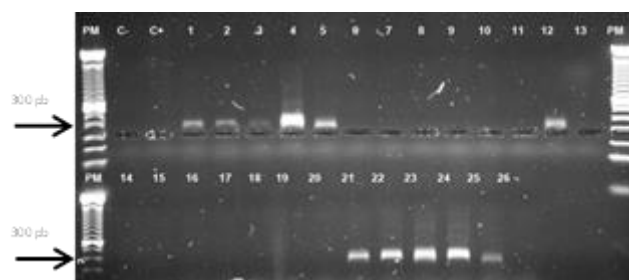
### Amplificação do gene 16S rRNA

Dois pares de iniciadores específicos para a análise de sequenciamento no Ion Torrent PGM (806R/515F e 1193R/967F) foram usados para amplificar as regiões V3 e V6 do gene 16S rRNA. Após inúmeras modificações dos protocolos disponíveis na literatura, foi possível obter produtos de PCR com tamanhos esperados de 291 pares de bases para a região V3 (806R/515F) do gene 16S rRNA (Figura 1). Como somente 11 amostras apresentaram produtos de amplificação, novos testes foram realizados com maior quantidade de DNA e menor temperatura de anelamento dos iniciadores. Após estes testes, um total de 15 amostras, do total de 26, apresentaram resultado positivo de amplificação para a região V3 do gene 16S rRNA.

Como as demais amostras não amplificaram, mesmo após inúmeras modificações no protocolo de amplificação, os iniciadores foram testados com um controle positivo e chegou-se a conclusão de que os iniciadores contendo os barcodes 7, 8, 9, 11, 13, 16, 17 e 20 não estavam funcionando.

Com relação à amplificação da região V6 (1193R/967F) do gene 16S rRNA, não foram obtidos produtos de amplificação com tamanho e qualidade adequados, sendo necessário novos ajustes para melhorar a eficiência da reação.

Para as análises de DGGE, após os testes de otimização das reações de amplificação por PCR para ambas as regiões do gene 16S rRNA, foi possível obter produtos de PCR com tamanhos esperados de 193 e 410 pares de bases para as regiões V3 e V6, respectivamente (Figura 2 A e B).



**Figura 1.** Gel de agarose 1% com produtos de PCR da região V3 do gene 16S rRNA obtidos com a combinação de iniciadores 806R e 515F. Legenda: PM: peso molecular; C-: controle negativo; C+ controle positivo; 1-20: amostras de DNA de solo com barcodes de 1 a 20, respectivamente. Amostras de 21 a 26: amostras de DNA de solo com barcodes de 1 a 6, respectivamente. A numeração das amostras está relacionada na tabela 2.

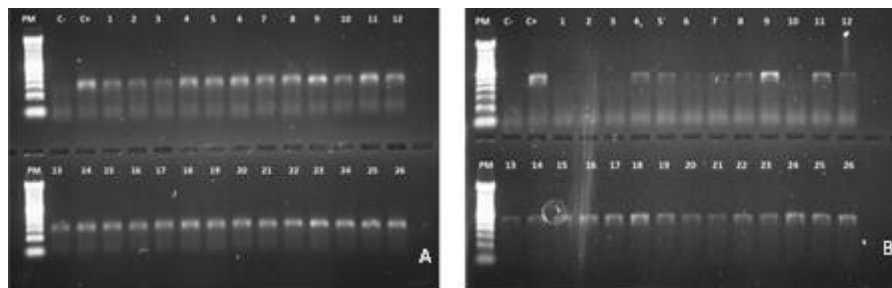
De maneira geral, os resultados obtidos, nas condições testadas, foram melhores para a região V3 do gene 16S rRNA quando comparada a região V6 do gene em questão. Isto foi observado tanto para os protocolos de sequenciamento de DNA - Ion Torrent PGM - quanto para o DGGE. Estes resultados corroboram os dados da literatura que relatam que os iniciadores para a região V3 são mais promissores para as análises de comunidades bacterianas em amostras ambientais, pois mostram maior eficiência na amplificação por PCR, além de maior cobertura taxonômica, diversidade e reprodutibilidade das análises (THIJS et al., 2017).

As próximas etapas do trabalho serão aplicar os produtos de PCR obtidos às técnicas de sequenciamento de DNA, utilizando a plataforma Ion torrent PGM e para o DGGE, de acordo com instruções dos fabricantes. Os dados gerados serão de grande importância para o conhecimento da comunidade microbiana, e sua variabilidade, nas diferentes amostras de solos multi-contaminadas submetidas ao processo de biorremediação.

## 5. Conclusões

Este trabalho mostra que, nas condições testadas, as diferentes metodologias de extração de DNA de amostras de solo apresentam diferenças na eficiência e qualidade do DNA obtido, influenciam diretamente nas etapas de amplificação dos genes de interesse. Com relação aos fatores inerentes a amplificação do gene 16S rRNA, incluindo a escolha dos iniciadores e as condições de PCR, é possível concluir que estes devem ser considerados como uma parte essencial dos desenhos experimentais, pois seus resultados interferem diretamente na alta ou baixa representatividade das técnicas para conhecimento da comunidade microbiana em questão. De maneira geral, nossos resultados são significativos, pois destacam considerações importantes para a concepção e interpretação de estudos de

sequenciamento de DNA de amostras ambientais. Como entramos num período de rápido desenvolvimento, progresso e melhoria das metodologias de sequenciamento, é de extrema importância considerar, avaliar e analisar continuamente os melhores protocolos para concepção, realização e interpretação de estudos de sequenciamento de microbiomas.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos de PCR da região V3 do gene 16S rRNA obtidos com a combinação de iniciadores P2R/P3\_LGC (A) e V6, com a combinação de iniciadores 968F\_LGC/1378R(B). Legenda: PM: peso molecular; C-: controle negativo; C+: controle positivo; 1 a 26: amostras de DNA de solo descritas na tabela 2.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida ao Programa de Capacitação Institucional e ao CETEM pela infraestrutura para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

## 7. Referências Bibliográficas

- ALBERTSEN M., KARST S.M., ZIEGLER A.S., et al. Back to Basics – The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. **PLoS ONE**, v.10, e0132783, 2015.
- CAPORASO J.G., LAUBER C.L., WALTERS W.A., et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v.6, p. 1621–1624, 2012.
- KENNEDY K.; HALL M.W.; LYNCH M.D.J.; et al. Evaluating bias of Illumina-based bacterial 16S rRNA gene profiles. **Appl Environ Microbiol.**, v. 80, p.5717–22, 2014.
- KLINDWORTH A., PRUESSE E., SCHWEER T., et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Res.** v. 41: e1, 2013.
- LUNDBERG D.S., YOURSTONE S., MIECZKOWSKI P. et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. **Nature Methods** v.10, p.999–1002, 2013.
- MEEBOON N.; KAEWSUWAN S., LEIGH M.B.; MANEERAT S. Assessment of the bacterial community of soils contaminated with used lubricating oil by PCR-DGGE. **J. Sci. Technol.** V.38, p.667-674, 2016.
- MORAIS D., PYLRO V., CLARK I.M., HIRSCH P.R., TÓTOLA M. Responses of microbial community from tropical pristine coastal soil to crude oil contamination. **PeerJ PrePrints** v.4:e1254, 2016.

- THIJS S., OP DE BEECK M., BECKERS B., TRUYENS S., STEVENS V., et al. Comparative Evaluation of Four Bacteria-Specific Primer Pairs for 16SrRNA Gene Surveys. **Front. Microbiol.** v.8, 15p., 2017.
- TREMBLAY, L.B., SCHMIDT G.A., PFIRMAN S., et al. Is ice-rafted sediment in a North Pole marine record evidence for perennial sea-ice cover? **Phil. Trans. Roy. Soc. A**, 373, no. 2052, 2015.
- WALTERS W., HYDE E.R., BERG-LYONS D., et al. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. **mSystems**, v.1, p.e00009-15, 2015.