



**Universidade do Algarve**  
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

**Avaliação da comunidade microbiana  
diazotrófica em solos sob cultura biológica por  
métodos moleculares**

Ana Raquel Andrade Veríssimo

Mestrado em Biologia Marinha  
Área de especialização Biotecnologia Marinha

2008



# **Universidade do Algarve**

## Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Tese de Mestrado realizada no Laboratório de Microbiologia do Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural, Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, entre Setembro de 2006 e Novembro de 2007.

### **Composição do júri:**

#### **Presidente**

Doutora Maria Ester Tavares Álvares Serrão, Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidades do Algarve;

#### **Vogais**

Doutora Maria Alcinda dos Ramos das Neves, Professora Auxiliar da Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais da Universidade do Algarve;

Doutora Maria Leonor Faleiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Engenharia e Recursos Naturais da Universidade do Algarve;

Doutor Mário João Gadanho, Investigador no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Dissertação orientada por Maria Leonor Faleiro

## RESUMO

O azoto, embora muito abundante na atmosfera, não pode ser utilizado pelas plantas na sua forma elementar, sendo obtido do solo sob a forma de nitrato e amónio. Uma vez que na prática da agricultura biológica não há adição de fertilizantes sintéticos, as bactérias do solo assumem um papel importante na fixação do azoto livre (comunidade diazotrófica). Estas bactérias podem ser simbiotes ou de vida livre, sendo a nitrogenase uma enzima chave no processo da fixação do N<sub>2</sub>.

Neste trabalho foram recolhidas amostras de solos de olivais sob agricultura biológica nas localidades de Amareleja, Serpa e Santa Iria e respectivos controlos, em terrenos adjacentes mobilizados, nos períodos de Inverno e Primavera. As comunidades microbianas foram caracterizadas por métodos moleculares (PCR-RFLP e TGGE) utilizando os genes *16S rRNA* e *nifH*, que codifica para a enzima nitrogenase.

A validade do uso de técnicas de biologia molecular para estudos ambientais depende da capacidade dos métodos usados em permitir a obtenção de DNA de qualidade e representativo das comunidades. No caso deste trabalho, o método não foi completamente otimizado, pois apenas foi possível fazer a caracterização das comunidades directamente a partir do solo para o gene *16S rRNA*, para o período de Inverno, tendo os restantes clones sido obtidos por métodos moleculares, mas a partir de métodos culturais.

Através das técnicas utilizadas verificou-se que as comunidades diazotróficas são diferentes entre as localidades, e a sua ausência nos locais utilizados como controlos. A comunidade diazotrófica menos diversa é a da localidade de Amareleja, o que poderá estar relacionado com um solo menos fértil e a perda da sementeira das leguminosas. No período de Inverno predominaram espécies diazotróficas de vida livre em todas as localidades, ao passo que na Primavera se verificou o predomínio de espécies simbióticas em Serpa e Santa Iria, pertencentes ao género *Sinorhizobium*. Em Amareleja, continuaram a dominar espécies de vida livre, pertencentes ao género *Azospirillum*. Este género foi também detectado em Serpa, no período de Primavera.

Os dados obtidos no presente estudo apontam para um estabelecimento efectivo da comunidade diazotrófica em solos sob agricultura biológica em contraste com os solos mobilizados nos quais a comunidade diazotrófica é praticamente inexistente.

Palavras-chave: comunidade diazotrófica, agricultura biológica, PCR-RFLP, TGGE

## ABSTRACT

Nitrogen, although very abundant in the atmosphere cannot be used by plants in its elemental form, thus being utilized by them as nitrate and ammonium. Since there is no addition of chemical fertilizers in biological agriculture, soil bacteria play an important role in nitrogen fixation (diazotrophic community). These bacteria can be free-living or symbiotic. Nitrogenase is a key enzyme in the process of nitrogen fixation.

In this work samples were collected from soils where olive trees are cultivated under biological agriculture regimens in Amareleja, Serpa and Santa Iria and respective controls, in adjacent lands where traditional agriculture is practised, in winter and spring periods. Microbial communities were characterized by molecular methods (PCR-RFLP e TGGE) using *16S rRNA* and *nifH* genes (*nifH* codes for nitrogenase).

The reliability of the application of molecular biology techniques to environmental studies depends on their capacity of obtaining quality and community-representative DNA. In this work, the method was not completely optimized, since it was only possible to characterize communities directly from the soil using *16S rRNA* gene, for samples corresponding to the winter period. The remaining clones were also obtained by molecular methods, but the samples were first subjected to cultural methods.

Through these techniques, it was possible to verify that diazotrophic communities are different between the three localities and that they're absent from control soils. The least diverse community is the one present in Amareleja, which can be related to a less fertile soil and the loss of legume plants. During the winter period, free-living species were predominant in all localities, while during spring the communities of Serpa and Santa Iria were dominated by symbiotic bacteria of the genus *Sinorhizobium*. In Amareleja, free-living species of the genus *Azospirillum* continue to dominate. This genus was also detected in Serpa, in samples corresponding to spring time.

Data obtained from this study indicate the effective establishment of the diazotrophic community in soils under biological agriculture regimens in contrast to soils under traditional agriculture management, where this community is nearly inexistent.

Key-words: diazotrophic community, biological agriculture, PCR-RFLP, TGGE

## AGRADECIMENTOS

Em poucas palavras, gostava deixar aqui os meus agradecimentos às pessoas que de alguma forma tornaram possível a realização desta tese, quer pelo apoio moral e encorajamento, quer pela disponibilidade, apoio técnico e logístico.

Em primeiro lugar, à Professora Leonor Faleiro, por me ter dado a oportunidade de integrar este projecto, pelos conselhos, pela dedicação e pela paciência.

À Elsa, à Liseta e a todas as colegas do laboratório, pela disponibilidade e simpatia.

Aos meus pais, irmão, avós, tios e primos, pela educação, carinho, apoio, compreensão e conselhos.

Aos meus colegas e amigos Wilson, Rui, Lígia, Juanita; Marta, Mariana, Lisa, Gonçalo, Jhony, Kilo, Maltez, Sónia e Tiago, que me ajudaram a crescer e a tornar-me numa pessoa melhor (pelo menos, gosto de pensar que sim!).

À Bela, porque esteve lá.

Não poderia também deixar de agradecer à (Professora Doutora) Sandra Chaves do ICAT/FCUL que, numa corrida contra o tempo, se disponibilizou para me ensinar e ajudar a fazer o TGGE, sempre com um sorriso no rosto.

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito do projecto “ Coberturas do solo no olival em produção biológica e convencional. Estabelecimento de campos de demonstração” (Agro 802).

## ABREVIATURAS

A – nucleótido contendo adenina

A<sub>230</sub> – absorvância a 230nm

A<sub>260</sub> – absorvância a 260nm

A<sub>280</sub> – absorvância a 280 nm

Água/DEPC – água MilliQ tratada com DEPC

Água MilliQ – água purificada no sistema MilliQ (Millipore)

ATP – trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*)

BLAST – Ferramenta básica de pesquisa de alinhamentos locais (*basic local alignment search tool*)

Bisacrilamida – N,N'-metileno-bis-acrilamida

C – nucleótido contendo citosina

cf – concentração final

CTAB – brometo de cetiltrimetilamónia (*cetyl trimethyl ammonium bromide*)

DAPI – 4'-6-diamidino-2-fenilindole (*4'-6-diamidino-2-phenylindole*)

DEPC – dietilpirocarbonato

DGGE – Electroforese em gel com gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DNase – desoxirribonuclease

dNTP – trifosfato de desoxinucleótido (*deoxynucleotide triphosphate*)

DO – densidade óptica

DSMZ – Coleção alemã de microrganismos e culturas de células (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*)

DTT – ditiotretitol

EDTA – ácido etileno-diaminatetracético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

FISH – Hibridação *in situ* por fluorescência (*Fluorescent in situ hybridization*)

g – grama

G – nucleótido contendo guanina

GES – Guanidina-EDTA-Sarcosil

GTE – Guanidina-Tris-EDTA

Kb – kilo pares de bases

Laranja de acridina – 3,6 – bis(dimetilamino)acridina

M – molar

MEGA – Análise de genética molecular evolutiva (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*)

min. – minuto(s)

ml – mililitro

mM – milimolar

MOPS – ácido 3-morfolinopropanosulfônico (*3-morpholinopropanesulfonic acid*)

mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)

NCBI – Centro nacional de informação sobre biotecnologia (*National Center for Biotecnology Information*)

nm – nanómetro

OTU – Unidade taxonómica operacional (*Operational taxonomic unit*)

pb – pares de bases

PCA – agar para contagem em placa (*plate count agar*)

PCR – Reacção da polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction*)

PVP – polivinilpirrolidona

RFLP – Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA – ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RNase – ribonuclease

rpm – rotações por minuto

rRNA – RNA ribossomal (*ribosomal RNA*)

Sarcosil – N-laurosilsarcosina

SDS – sulfato de sódio dodecil (*sodium dodecyl sulphate*)

T – nucleótido contendo timina

TAE – Tris-ácido acético-EDTA

T<sub>amb.</sub> – temperatura ambiente

Taq – DNA polimerase de *Thermophilus aquaticus*

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

TGGE – Electroforese em gel com gradiente térmico (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*)

T-RFLP – Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição da zona terminal (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

T<sub>m</sub> – temperatura de emparelhamento (*Temperature of melting*)

U – unidades (enzimáticas)

UPGMA – Método de análise de pares de grupos não ponderada (*Unweighted pair groups method analysis*)

UV – ultra-violeta

V – volt(s)

X-Gal – 5-bromo-5-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

μl – microlitro

2D-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (*Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*)

## ÍNDICE

<u>ASSUNTO</u>	<u>PÁGINA</u>
<b>1 – Introdução</b> .....	1
1.1 – A fertilização biológica como alternativa à fertilização química .....	1
1.2 – O ciclo do azoto.....	2
1.3 – A importância da comunidade bacteriana diazotrófica para a agricultura biológica.....	5
1.3.1 – A enzima nitrogenase e a fixação biológica de azoto.....	9
1.4 – A descrição das comunidades microbianas através de métodos culturais <i>versus</i> moleculares .....	11
1.4.1 – Métodos de obtenção de ácidos nucleicos a partir de amostras de solo.....	14
1.4.2 – A técnica de PCR e polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP).....	15
1.4.3 – Electroforese em Gradiente Térmico (TGGE).....	15
1.4.4 – Estudos de filogenia com genes estruturais <i>versus</i> genes funcionais.....	16
1.5 – Objectivos.....	18
<b>Fluxograma</b> .....	19
<b>2 – Material e Métodos</b> .....	20
2.1 – Recolha das amostras de solo e caracterização dos locais de amostragem.....	20
2.2 – Extracção simultânea de DNA e RNA .....	21
2.3 - Extracção de DNA pelo método Guanidina, EDTA e sarcosil (GES).....	24
2.4 – Purificação de DNA e RNA das amostras.....	25
2.5 – Quantificação dos ácidos nucleicos.....	25
2.6 – Reacção de amplificação por reacção em cadeia da Polimerase (PCR).....	25
2.6.1 – Os <i>primers</i> .....	26
2.6.2 – Optimização das reacções de PCR.....	28
2.7 – Purificação dos produtos de PCR.....	30
2.8 – Purificação de bandas a partir do gel de agarose.....	30

2.9 – Clonagem.....	30
2.9.1 – Preparação das células competentes para transformação.....	30
2.9.2 – Reacção de ligação.....	31
2.9.3 – Transformação das células competentes.....	31
2.10 – PCR- <i>colony</i> .....	31
2.11 – Análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição dos produtos de PCR (RFFLP) .....	32
2.11.1 – Escolha das enzimas de restrição.....	32
2.11.2 – Digestão enzimática.....	33
2.12 – Extracção de DNA plasmídico por lise alcalina .....	33
2.13 – Método de extracção de ácidos nucleicos a partir amostras de solo, segundo o método utilizado por Miller <i>et al.</i> (1999).....	33
2.14 – Obtenção de culturas mistas a partir de amostras de solo.....	34
2.15 – Electroforese em gradiente térmico (TGGE).....	35
2.15.1 – Definição do gradiente térmico e corrida das amostras.....	35
2.15.2 – Coloração com nitrato de prata.....	36
2.16 – Sequenciação.....	36
2.17 – Análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição dos produtos de PCR...36	
2.18 – Análise <i>in silico</i> .....	37
2.19 – Cálculo de índices de diversidade.....	37
<b>3 – Resultados</b> .....	37
3.1 – Optimização do método de extracção de ácidos nucleicos.....	38
3.2 – Utilização dos polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) em filogenia..40	
3.3 – Caracterização da diversidade das comunidades bacterianas através da amplificação do DNA directamente extraído do solo.....	45
3.4 – Caracterização da diversidade das comunidades bacterianas por amplificação do DNA extraído de culturas.....	48

3.5 – Electroforese em gel com gradiente térmico.....	56
3.6 – Índices de diversidade e equidade .....	58
<b>4 – Discussão</b> .....	<b>62</b>
4.1 – Optimização do método de extracção de ácidos nucleicos.....	62
4.2 – Caracterização da diversidade das comunidades bacterianas através da amplificação do DNA directamente extraído do solo <i>versus</i> DNA extraído de culturas bacterianas, por PCR-RFLP.....	65
4.3 – Electroforese em gel com gradiente térmico (TGGE).....	69
4.4 – Relação entre a diversidade da comunidade diazotrófica e as características do solo.....	70
<b>5 – Considerações finais e perspectivas futuras</b> .....	<b>74</b>
<b>6 – Referências</b> .....	<b>77</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>PÁGINA</u>
<b>1 – Introdução</b>	
Figura 1.2.1 – Ciclo do azoto.....	3
Figura 1.3.1.1 – Fixação de azoto através da nitrogenase.....	10
<b>3 – Resultados</b>	
Figura 3.1.1 – DNA genómico e RNA extraídos de amostras de solo.....	39
Figura 3.2.1 – Árvore filogenética com base nos RFLPs para o DNA amplificado com os <i>primers</i> 16S a partir de DNA extraído directamente do solo (amostras colhidas no período de Inverno).....	41
Figura 3.2.2 – Árvore filogenética baseada nos RFLPs para os clones obtidos a partir de cultura em meio PCA, utilizando o gene 16S rRNA (Inverno e Primavera).42	
Figura 3.2.3 – Árvore filogenética baseada nos RFLPs para os clones obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, utilizando os fragmentos obtidos com os <i>primers</i> para o gene <i>nifH</i> de <i>Rhizobium</i> (a1), <i>nifH</i> de <i>Azotobacter</i> (g1) e <i>nifH</i> universal (UA) (período de Inverno).....	43
Figura 3.2.4 – Árvore filogenética baseada nos RFLPs para os clones obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, utilizando os fragmentos obtidos com os <i>primers</i> para o gene <i>nifH</i> de <i>Rhizobium</i> (a1) e <i>nifH</i> universal (UA) (período de Primavera).....	44
Figura 3.3.1 – Árvore filogenética para os clones obtidos (correspondentes ao período de Inverno), através da amplificação do gene 16S rRNA (a partir de DNA extraído directamente do solo).....	46
Figura 3.4.1 – Árvore filogenética para os clones obtidos a partir de cultura em PCA, com base nas sequências do gene que codifica o 16S rRNA (Inverno e Primavera).....	50
Figura 3.4.2 – Árvore filogenética construída com base nas sequências do gene <i>nifH</i> de <i>Rhizobium</i> (a1), <i>nifH</i> de <i>Azotobacter</i> (g1) e <i>nifH</i> universal (UA) para para os clones de organismos diazotróficos obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, para as amostras colhidas no período de Inverno.....	51
Figura 3.4.3 – Árvore filogenética construída com base nas sequências do gene <i>nifH</i> de <i>Rhizobium</i> (a1), <i>nifH</i> de <i>Azotobacter</i> (g1) e <i>nifH</i> universal (UA) para para os	

clones de organismos diazotróficos obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, para as amostras colhidas no período de Primavera.....	53
Figura 3.5.1 – Electroforese em gel com gradiente térmico das amostras amplificadas com o par de <i>primers</i> específico para o gene <i>nifH</i> do género <i>Azotobacter</i> , com <i>clamp</i> GC.....	56
Figura 3.6.1 – Índices de diversidade de Shanon e Simpson (1-D) e equidade, para os clones obtidos com os <i>primers</i> direccionados para o gene 16S rRNA utilizando DNA directamente extraído das amostras de solo (A) e DNA extraído a partir da cultura das amostras em meio PCA (B).....	59
Figura 3.6.2 – Índices de diversidade de Shanon e Simpson (1-D) e equidade, para os clones obtidos com os <i>primers</i> direccionados para o gene <i>nifH</i> utilizando DNA extraído a partir da cultura das amostras em meio manitol-levedura.....	60

## ÍNDICE DE TABELAS

<u>TABELA</u>	<u>PÁGINA</u>
<b>1 – Introdução</b>	
Tabela 1.3.1 – Relação de alguns géneros bacterianos com o oxigénio e a luz.....	6
Tabela 1.3.2 – Diferentes espécies do género <i>Rhizobium</i> e seus simbiosites.....	7
Tabela 1.3.3 – Organismos fixadores de azoto que contribuem para a agricultura.....	8
Tabela 1.4.1 – Fontes de carbono pouco comuns utilizadas por fixadores de azoto livres.....	13
<b>2 – Material e métodos</b>	
Tabela 2.6.1.1 – <i>Primers</i> utilizados para a caracterização da comunidade microbiana presente em cada amostra de solo.....	27
Tabela 2.6.2.1 – Composição de cada reacção de amplificação.....	29
Tabela 2.6.2.2 – Condições das reacções de amplificação por PCR.....	29
<b>3 – Resultados</b>	
Tabela 3.1.1 – Comparação do rendimento em DNA, RNA e a respectiva pureza obtidos através dos diferentes métodos utilizados para extrair ácidos nucleicos do solo.....	38
Tabela 3.4.1 – <i>Taxa</i> detectados com os diferentes pares de <i>primers</i> , a partir de cultura ou por extracção directa do DNA.....	55