

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
COORDENADORIA ESPECIAL DE OCEANOGRAFIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

Andrew Vinicius Wotter Schiavon

**Caracterização da comunidade microbiana do sedimento marinho da costa de Santa
Catarina em diferentes profundidades.**

Florianópolis
2022

Andrew Vinicius Wotter Schiavon

Caracterização da comunidade microbiana do sedimento marinho da costa de Santa Catarina em diferentes profundidades.

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Oceanografia do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Schiavon, Andrew Vinicius Wotter
Caracterização da comunidade microbiana do sedimento
marinho da costa de Santa Catarina em diferentes
profundidades / Andrew Vinicius Wotter Schiavon ;
orientador, Rubens Tadeu Delgado Duarte, 2022.
49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Físicas e Matemáticas, Graduação em Oceanografia,
Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Oceanografia. 2. Oceanografia. 3. Comunidade
microbiana. 4. RNAr 16S. 5. Sedimento marinho. I. Duarte,
Rubens Tadeu Delgado. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Oceanografia. III. Título.

Andrew Vinicius Wotter Schiavon

Caracterização da comunidade microbiana do sedimento marinho da costa de Santa Catarina em diferentes profundidades.

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Oceanografia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Oceanografia.

Florianópolis, 15 de julho de 2022.

Profª. Dra. Alessandra Larissa D'Oliveira Fonseca
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. PhD. Rubens Tadeu Delgado Duarte
Orientador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

PhD. Amanda Gonçalves Bendia
Avaliadora
Instituto Oceanográfico Universidade de São Paulo

PhD. Natascha Menezes Bergo
Avaliadora
Instituto Oceanográfico Universidade de São Paulo

Para minha família, amigos e a todos que amam o mar.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao curso de graduação em Oceanografia.

A meu querido Pai, Juares Ferreira Gomes por todo o apoio, amor e a toda hombridade a mim passada. A Minha Mãe, Luciara Brum Wotter e a minha querida irmã, Paola Wotter Gomes que sempre me apoiaram, mesmo diante de todos os problemas e situações que a vida nos impõe.

A minha família que mesmo distante e nos piores momentos me ajudou, Gisele, Gerson, Wendell, Bruno, Silvana, Eveline, obrigado por todo o apoio e amor.

As minhas avós Teresa e Jandira, por me ajudarem a chegar até aqui.

A minha querida família de amigos, Anderson Molina, Danubia, Vitória, Natália, Nicolas, Pablo, Bruno, Eduardo Maraschin, Líria, Matheus Ikezawa e Rodrigo agradeço a eles por terem me ajudado a crescer como pessoa e por todo o suporte ao longo desses anos.

A Bruna Seminiuk por toda ajuda, horas de sono perdidas, apoio emocional, conversas e por despertar essa paixão pela microbiologia. Obrigado!

Ao meu querido orientador Rubens, com toda a certeza do mundo, essa graduação só foi concluída por existirem pessoas que como ele cativam e tem o dom de passar o conhecimento aos demais. Muito obrigado, por todo o apoio, cobrança e conhecimento passado.

Aos meus amigos feitos neste período, Barbara, Giulia Brocardo, Matheus Sombrio, Wicent, Kaoã, Lua, Eduarda, Renata, Gabriel, Malu, Gabriel G8, Heitor, Wilson, Júlio e muitos outros, os longos cinco anos de graduação foram mais fáceis, divertidos e engrandecedores por conta de vocês.

As minhas queridas amigas, psicólogas e veteranas Hillary e Luana, obrigado por todo apoio, carinho, cobrança e tempo compartilhado.

Aos meus amigos de vida e do LIDI, Daniel e Carol, obrigado por toda a ajuda e equipamentos emprestados.

A Joana por ter me ajudado a tornar este trabalho possível e aos demais colegas de laboratório.

A toda a equipe do Laboratório de Ensino Flutuante Ciências do Mar 1 e a FURG.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para meu crescimento pessoal ou profissional ao longo destes cinco anos.

“Desde o nascimento, o homem carrega o peso da gravidade em seus ombros. Ele está aparafusado no chão. Mas o homem tem apenas que afundar abaixo da superfície e ele é livre.”

Jacques-Yves Cousteau

RESUMO

O litoral de Santa Catarina encontra-se em sua maior parte dentro da Plataforma Continental Sudeste do Brasil (PCSE) e o entendimento sobre os microrganismos presentes no habitat marinho, principalmente nesta região, ainda é muito escasso. Assim, realizou-se uma análise do sedimento de diferentes pontos de coleta com a finalidade de avaliar como os fatores físico-químicos, o distanciamento da linha de costa e a profundidade dos sedimentos influenciam na estruturação da comunidade microbiana. As análises foram realizadas em sedimentos coletados próximo à Garopaba-SC e ao Arquipélago de Moleques do Sul. O estudo foi realizado através de métodos moleculares baseados na análise do gene RNAr 16S das populações presentes em cada ambiente, especificamente com uso da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que, embora os parâmetros físico-químicos dos sedimentos sejam similares entre si conforme a profundidade, a comunidade microbiana se estrutura inicialmente conforme a localidade, e em seguida pela profundidade do sedimento. Além disso, parâmetros físico-químicos como salinidade, pressão e saturação de oxigênio estão correlacionados com as amostras mais profundas em Moleques, enquanto a comunidade microbiana de Garopaba está mais correlacionada à temperatura da água. Os resultados deste trabalho contribuíram para melhor compreensão da comunidade microbiana em sedimentos marinhos, sobretudo na região da costa Sul do Brasil, onde há uma escassez de estudos de forma geral.

Palavras-chave: Comunidade microbiana. RNAr 16S. Sedimento marinho. Costa de Santa Catarina. Plataforma continental.

ABSTRACT

The coast of Santa Catarina is mostly within the Southeast Continental Shelf of Brazil (PCSE), and the understanding of microorganisms present in the oceanic habitat and especially in this region is very scarce. Thus, an analysis of the sediment from different collection points was carried out in order to evaluate how the physical-chemical factors, the distance from the coastline and the depth of the points cause variation in the bacterial community structure. The analysis was made on marine sediments sampled close to Garopaba-SC and the Moleques do Sul Archipelago. This comparison was made using molecular methods based on the analysis of the 16S rRNA gene of the species present in each environment, specifically using a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approach. The results obtained in this work showed that, despite the physicochemical parameters clustered among each other as a function of depth, the microbial community structure clustered primarily due to the sediment location, and secondly due to sediment depth. In addition, physicochemical parameters such as salinity, pressure and oxygen saturation are directly correlated with deeper sediments in Moleques, while the microbial community in Garopaba was correlated with water temperature. The results of this work contribute to a better understanding of the microbial community of marine sediments, specially in the southern coast of Brazil, where there is a lack of studies in general.

Keywords: Microbial community. 16S rRNA. Marine sediment. Santa Catarina coast. Continental shelf.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Feições oceânicas.....	16
Figura 2 – Os três domínios da vida.....	17
Figura 3 – PCSE (profundidade em metros).	22
Figura 4 – Laboratório de Ensino Flutuante Ciências do Mar 1 (LEFCM 1).	23
Figura 5 - Transectos realizados pelo Décimo Sétimo Cruzeiro a bordo do LEFCM I. Transecto vermelho representa os pontos amostrais de Garopaba e o transecto amarelo representa os pontos amostrais do Arquipélago de Moleques do Sul.	23
Figura 6 – Amostragem com box corer.	25
Figura 7 – Sedimento coletado em um dos sítios amostrais.....	25
Figura 8 – (A) Corrida do DGGE; (B) Avaliação da PCR; (C) Aplicação das amostras no gel.	27
Figura 9 - DNA total das amostras após corrida em eletroforese com gel de agarose 1%. As canaletas indicam: 1) Marcador de peso molecular Ladder 1 Kb (Ludwig); 2) M1A; 3) M1B; 4) M2A; 5) M2B; 6) M3A; 7) M3B; 8) G1A; 9) G1B; 10) G2A; 11) G2B; 12) G3A; 13) G3B.	31
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% contendo o produto de PCR amplificado com os primers de DGGE. As canaletas indicam: 1) Marcador de peso molecular Ladder 1 Kb (Ludwig); 2) Controle negativo (C -); 3) Controle positivo <i>Escherichia coli</i> (C+); 4) Controle positivo (C+); 5) M1A; 6) M1B; 7) M2A; 8) M2B; 9) M3A; 10) M3B; 11) G1A; 12) G1B; 13) G2A; 14) G2B; 15) G3A; 16) G3B.	31
Figura 11 - Gel de eletroforese em gradiente desnaturante 50-75% após coloração com nitrato de prata. As canaletas apresentam o perfil de bandas das amostras de Garopaba (G1A até G3B) e Moleques (M1A até M3B). As canaletas Ld contém marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Ludwig).	33
Figura 12 - Dendrograma de similaridade Bray-Curtis das amostras de sedimento de Garopaba (G1A, G1B, G2B, G3A) e Moleques (M1A, M1B, M2A, M2B, M3A e M3B) em termos de presença e ausência de filotipos. A legenda indica a isóbata da amostra em metros.	34
Figura 13 - Dendrograma de distância Euclidiana das amostras de sedimento de Garopaba (G1A, G1B, G2B, G3A) e Moleques (M1A, M1B, M2A, M2B, M3A e M3B) em termos dos parâmetros físico-químicos. A legenda indica a isóbata da amostra em metros.	35

Figura 14 - Análise de componentes principais (PCA) entre os dados biológicos obtidos no DGGE e os parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento. Os círculos azuis indicam as amostras de Garopaba (G1A até G3A) e Moleques (M1A até M3B). As legendas dos vetores representam a temperatura (temp), fluorescência (fluoresc), saturação de oxigênio (oxsat), profundidade (depth), pressão (press), salinidade (sal), matéria orgânica (morg) e a espessura do sedimento (argila, silte e areia). Os vetores press e depth ficaram sobrepostos entre si. A porcentagem de explicação da PC1 foi 29,8% e da PC2 foi 22,6%.36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Primers utilizados e suas especificações.	26
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Locais de amostragem.	24
Tabela 2 – Dados físico-químicos obtidos por sonda CTD Sea-Bird nos sítios de amostragem.	29
Tabela 3 – Análise granulométrica e de matéria orgânica para os pontos amostrais.	29
Tabela 4 - Concentração de DNA presente em cada amostra.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DGGE - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético
FURG – Universidade Federal do Rio Grande
LEFCM - Laboratório de Ensino Flutuante Ciências do Mar 1
mM - miliMolar
PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCSE - Plataforma Continental Sudeste do Brasil
RNAr – RNA ribossômico
TAE – Tris – Acetato - EDTA
UV - Ultra Violeta

SUMÁRIO

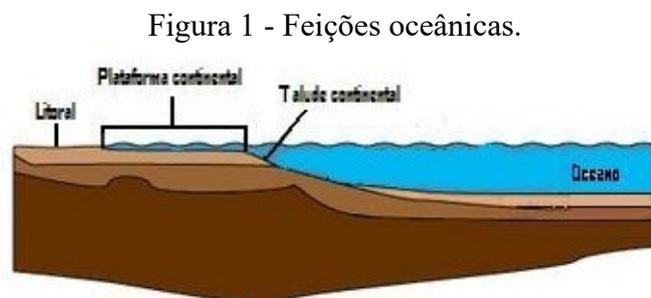
1	INTRODUÇÃO	16
1.1	SEDIMENTOS MARINHOS.....	16
1.2	ECOLOGIA MICROBIANA NOS SEDIMENTOS MARINHOS	18
1.3	OBJETIVOS	20
1.3.1	Objetivo Geral.....	20
1.3.2	Objetivos Específicos	20
2	METODOLOGIA.....	21
2.1	ÁREA DE ESTUDO	21
2.2	AMOSTRAGEM DE CAMPO	24
2.3	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL	25
2.4	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)	26
2.5	GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE) ...	27
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1	RESULTADOS OBTIDOS EM CAMPO.....	28
3.2	ESTRUTURA DE COMUNIDADE MICROBIANA	30
3.2.1	Amplificação do gene RNAr 16S.....	30
3.2.2	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante.....	32
3.3	ANÁLISE DA ESTRUTURA DE COMUNIDADE DOS SEDIMENTOS MARINHOS.....	33
4	CONCLUSÃO.....	38
5	REFERÊNCIAS.....	39
	ANEXO A – PowerSoil DNA Isolation Kit	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEDIMENTOS MARINHOS

Aproximadamente 71% da superfície do planeta é ocupada pelos oceanos (Harper; Hawksworth, 1994). Os fundos oceânicos possuem certa semelhança com os continentes uma vez que apresentam grande variedade de feições. Próximo aos continentes, na margem continental, há uma diversidade de configurações possíveis, mas na costa brasileira pode-se identificar, em termos morfológicos, a plataforma continental, o talude continental e a elevação continental Tessler & Mahiques (2000).

A plataforma continental (Figura 1) é assim denominada por apresentar um declive até profundidades de aproximadamente 200 m e em seguida tem como continuação o talude continental, o qual apresenta um grande declive até próximo de 4 km de profundidade, aproximando-se das planícies abissais, as quais são ligeiramente planas e apresentam profundidades entre 4-6 km e abrangem extensas áreas do fundo oceânico (Carvalho & Paranhos, 2010).



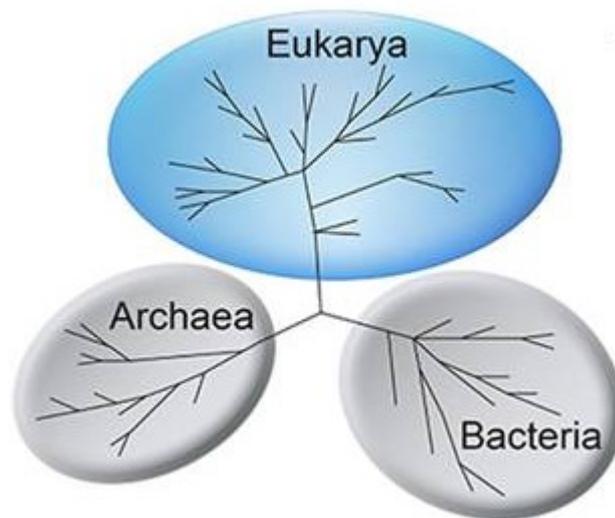
Fonte: Towiki60 via Wikimedia Commons.

O Brasil apresenta o mais extenso litoral inter e subtropical do mundo, possui ecossistemas marinhos de características únicas e inexploradas. Transitando entre águas tropicais e temperadas, estando sujeito a influência da Corrente do Brasil (CB) e da Corrente das Malvinas (CM). Água Central do Atlântico Sul (ACAS) rica em nutrientes fornece condições especiais para altos níveis de produção primária ao longo do litoral.

O ecossistema marinho apresenta uma grande variabilidade de fatores físico-químicos, tais como temperatura, pressão, salinidade, fluorescência e densidade. Uma vasta biodiversidade microbiana habita diferentes frações do oceano, incluindo espécies pertencentes aos 3 domínios da vida (Archaea, Bactéria e Eukarya) (Figura 2). Estima-se que no ambiente

marinho habitam cerca de $3,6 \times 10^{28}$ células microbianas a uma densidade média de 5×10^5 células. mL⁻¹ (Cock *et al.* 2010).

Figura 2 – Os três domínios da vida.



Fonte: Stat et Al via Wikimedia Commons.

A produção primária no oceano é essencialmente realizada por microrganismos marinhos, os quais são responsáveis por aproximadamente 98% da geração de matéria orgânica (MO) destes ambientes. Nos sedimentos de superfície, o material orgânico que chega é primariamente composto por substâncias orgânicas produzidas na zona eufótica classificadas como matéria orgânica dissolvida (MOD) e matéria orgânica particulada (MOP) (Soares & Figueiredo, 2002). Estas fontes orgânicas, ricas em carbono, nitrogênio e fósforo, nutrem a comunidade microbiana dos sedimentos marinhos, possibilitando a produção de biomassa e respiração (Danovaro *et al.* 2008).

Sedimentos profundos são geralmente ambientes com limitação de recursos orgânicos, cuja disponibilidade afeta a abundância e a distribuição dos organismos bentônicos. Estes recursos são provenientes da zona fótica ou trazidos por movimentos de massas d'água, atingindo, por fim, a superfície do sedimento (Gage 2003, Rex *et al.* 2006). Este panorama difere da realidade de ambientes marinhos costeiros, rios e lagos, onde a entrada de material orgânico alóctone fornece substratos orgânicos adicionais, possibilitando maior produtividade nestes ecossistemas (Bott & Kaplan 1990). Exceções ao modelo oceânico são os locais quimiossintéticos (Rex *et al.* 2006), considerados verdadeiros 'oásis' estes ambientes abrigam

concentrações de biomassa muitas ordens de grandeza acima da normalmente observada para regiões profundas (Gage & Tyler 1991).

Em escalas locais, o fluxo de carbono ao fundo oceânico e sua utilização pelos organismos bentônicos podem ser estimados diretamente por meio da implantação de armadilhas de sedimentos (*sediment traps*) e pela determinação do consumo de oxigênio pela comunidade do sedimento (Smith *et al.* 2001). Atualmente, existem poucas medidas deste tipo para fornecer uma quantificação razoável da disponibilidade de alimento em grandes escalas geográficas, medidas estas essenciais para a compreensão do ciclo global do carbono (Rex *et al.* 2006).

A atividade microbiana nos sedimentos de bacias oceânicas profundas é restrita em muitos sentidos. Limitação de recursos alimentares, baixas temperaturas e alta pressão hidrostática levam a baixas densidades populacionais e lentas taxas de renovação de nutrientes, exigindo estratégias fisiológicas específicas para sobrevivência e crescimento sob tais condições (Bolliger *et al.* 1991). Mesmo assim, o perfil de distribuição em função da profundidade das células bacterianas em divisão e já divididas é equivalente a uma porcentagem constante (~4,8%) da população total (Parkes *et al.* 1994). A presença de células em divisão indica que uma proporção da população bacteriana total é ativa e viável, visto que o número de células em divisão se correlacionou com a medida independente de produtividade bacteriana (baseada na incorporação de 3H-timidina) em sedimentos profundos.

A biodiversidade microbiana do sedimento marinho apresenta grande potencial para exploração e descoberta de novos compostos naturais de interesse para a indústria, sobretudo nas áreas farmacêutica e biotecnológica. Apesar disso, poucos estudos têm explorado este recurso natural, quando comparado à diversidade microbiana no ambiente terrestre ou associada a plantas e animais

1.2 ECOLOGIA MICROBIANA NOS SEDIMENTOS MARINHOS

Estudos de ecologia microbiana tem como objetivo a caracterização da estrutura de comunidade de microrganismos em um ambiente, onde dados sobre a abundância e distribuição das espécies são obtidos e comparados. Historicamente, esses estudos são realizados a partir do cultivo dos microrganismos em meios de cultura em laboratório, na tentativa de simular o ambiente natural que eles vivem. A partir da contagem das colônias que se desenvolvem em cultura, os dados de abundância podem ser computados. Entretanto, apenas cerca de 1% dos

microrganismos ambientais são cultivados em laboratório devido às limitações dos meios de cultura e condições de cultivo (Staley; Konopka, 1985). No ambiente marinho, por conta da escassez de estudos de diversidade microbiana, esta fração cultivável é estimada em apenas 0,01% (Giovanonni et al., 2017).

Com objetivo de contornar esta limitação, estudos baseados na análise de marcadores moleculares vêm sendo conduzidos na tentativa de caracterizar uma porção maior da biodiversidade. Um dos marcadores moleculares mais utilizados para esta finalidade é o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo bacteriano (gene RNAr 16S).

O Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE) é uma técnica que separa fragmentos de DNA através do grau de Adenina e Timina (A:T) ou Guanina e Citosina (G:C) das moléculas (Duarte, 2010). Esse efeito é possível pela ação dos agentes químicos (ureia e formamida) presentes no gel de eletroforese, em concentração gradual e crescente, que são capazes de destruir as pontes de hidrogênio do par A:T (mais fracas) e G:C (mais fortes) (Duarte, 2010). Como a velocidade de migração do DNA na eletroforese é modificada quando a molécula está fita dupla, fita simples, ou parcialmente fita simples, os fragmentos de DNA de sequência nucleotídica distinta migram com velocidades diferentes. Desta forma, o DGGE é capaz de identificar quantas moléculas de DNA diferentes existem em uma amostra.

Na área de microbiologia ambiental, o DGGE pode ser utilizado para caracterizar a estrutura de comunidade microbiana. Para isso, as moléculas de DNA a serem analisadas devem ser espécie-específicas, ou seja, genes que funcionem como marcadores taxonômicos. Entre os marcadores taxonômicos mais empregados em microbiologia destaca-se o gene ribossomal 16S (RNAr 16S), pois a taxa de mutação neste gene é sincronizada com a taxa de especiação das bactérias; desta forma cada espécie bacteriana possui um gene RNAr 16S com sequência nucleotídica diferente.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a estrutura da comunidade microbiana de sedimentos marinhos da costa de Santa Catarina em diferentes profundidades.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a estrutura da comunidade microbiana em sedimentos marinhos da costa de Santa Catarina.
- Descrever a influência da profundidade sobre a estrutura da comunidade.
- Compreender a relação dos parâmetros físico-químicos com a diversidade microbiana dos sedimentos analisados.

2 METODOLOGIA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

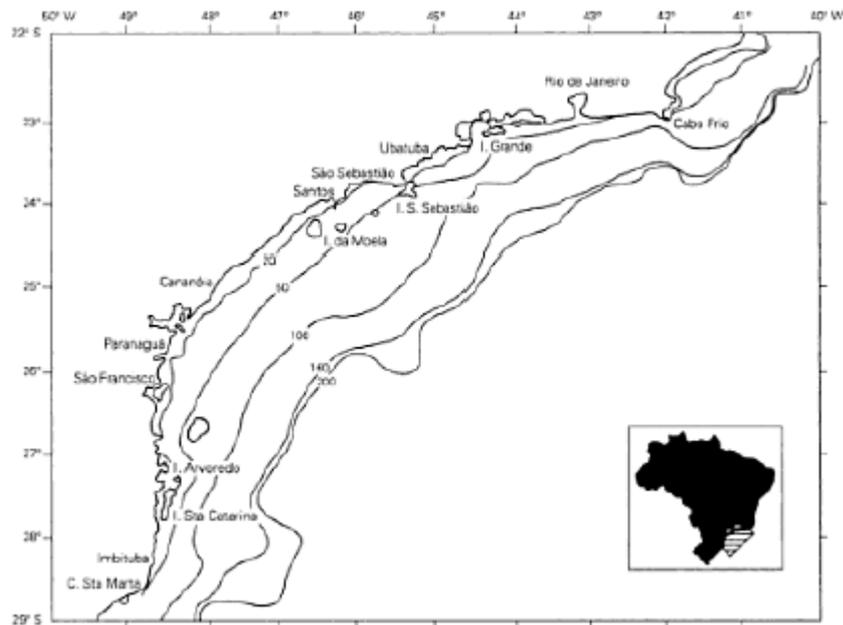
O presente estudo utilizou amostras de sedimento marinho coletadas na Plataforma Sul do Brasil como modelo de comunidade microbiana. A Plataforma Sul do Brasil, localizada no sudoeste do Oceano Atlântico, se estende do Cabo São Tomé (21°S) até Chuí (33°S). As águas da Plataforma Sul do Brasil podem ser divididas em três grandes regiões latitudinais de acordo com suas características oceanográficas, de norte a sul: a região do Cabo São Tomé - Cabo Frio, a Bacia Sul do Brasil e a Plataforma Subtropical Sul. Ao longo de toda a encosta, a Água Tropical (AT) oligotrófica quente e salgada é transportada para o sul pela Corrente do Brasil (CB) na camada superior da coluna d'água, enquanto a Água Central do Atlântico Sul (ACAS) rica em nutrientes fornece condições especiais para altos níveis de produção primária ao longo do litoral.

O litoral de Santa Catarina está na Bacia Sul do Brasil essa delimitada a norte por Cabo Frio (22°52'S), ao sul pelo Cabo de Santa Marta (28°36'S), a oeste pela linha de costa e leste pelo declive da plataforma (Figura 3) (Cechinel 2015; Castro 1990). A Bacia Sul do Brasil é caracterizada pela presença da Água da Plataforma Continental em sua porção norte, e pela Água de Plataforma Subtropical em sua área sul. A Água de Plataforma Subtropical é o resultado de uma mistura das águas da Pluma do Prata e AT, e se espalha por toda a região da Bacia Sul do Brasil e pela Plataforma Subtropical Sul. Na região da Bacia Sul do Brasil, a ACAS contribui para uma alta concentração de nitrato principalmente perto de Cabo Frio e Cabo Santa Marta (Castro, 1996; Castro e Miranda, 1998).

Entre o Cabo Santa Marta e o estuário de La Plata (35°S), a Plataforma Subtropical Sul é caracterizada pela propagação para o norte da água relativamente fria e fresca das águas da Pluma do Prata. Este transporte é mais intenso durante o inverno austral, quando a Água de Plataforma Subantártica também é transportada para o norte pela Corrente Patagônica (CP), o que resulta em uma massa de água fria entre Águas da Pluma do Prata e Água de Plataforma Subtropical (Castro, 1996; Castro e Miranda, 1998). Uma circulação termohalina frontal existe entre Água de Plataforma Subtropical e Água de Plataforma Subantártica em torno de 33°S, denominada Frente Subtropical de Plataforma (FSTP), que aumenta a disponibilidade de nutrientes locais na zona eufótica, a produção primária e abundância de organismos.

A área de estudo está localizada entre a Ilha de Santa Catarina (27° S), SC e a região de Garopaba (28° S), SC. Os dois transectos realizados durante o Décimo Sétimo Cruzeiro a bordo do Laboratório de Ensino Flutuante Ciências do Mar I (LEFCM I) foram perpendiculares a linha de costa nas localidades de Garopaba (SC) e no Arquipélago de Moleques do Sul (Florianópolis – SC), entre as isóbatas de 20m e 100m (Figura 5).

Figura 3 – PCSE (profundidade em metros).



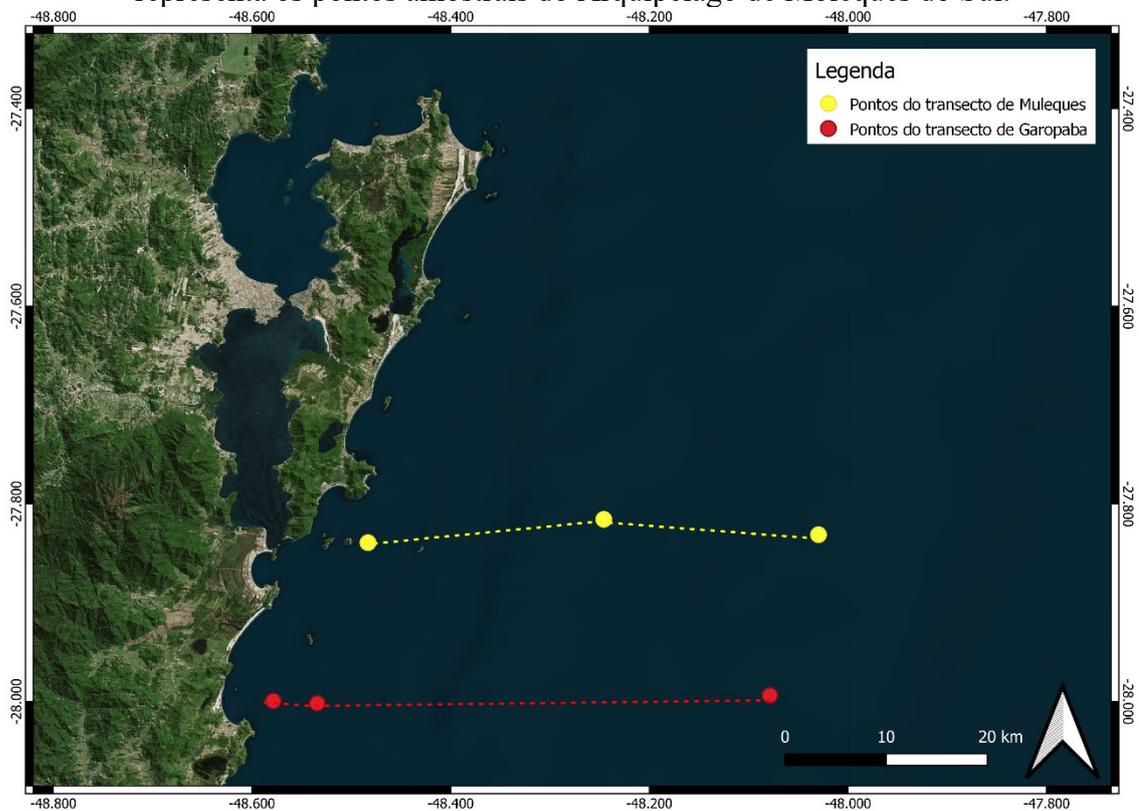
Fonte: Cechinel 2015; Castro 1990.

Figura 4 – Laboratório de Ensino Flutuante Ciências do Mar 1 (LEFCM 1).



Fonte: O autor (2019).

Figura 5 - Transectos realizados pelo Décimo Sétimo Cruzeiro a bordo do LEFCM I. Transecto vermelho representa os pontos amostrais de Garopaba e o transecto amarelo representa os pontos amostrais do Arquipélago de Moleques do Sul.



Fonte: O autor (2021).

2.2 AMOSTRAGEM DE CAMPO

As amostragens ocorreram entre o período de 06/05/2019 e 10/05/2019. O LEFCM I teve seu transecto previamente demarcado em decorrência dos acordos pré-estabelecidos entre a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com a Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), o Ministério da Educação (MEC) e de reunião prévia entre os professores que se fizeram presentes a bordo do Décimo Sétimo Cruzeiro, no qual foram coletados diferentes tipos de dados físico-químicos, biológicos e geológicos.

A coleta do sedimento marinho para utilização no estudo foi feita em 6 pontos amostrais de diferentes profundidades (Tabela 1 e Figura 4), utilizando-se de um amostrador de fundo box corer (Figura 6), em cada ponto foram realizados dois lanços do box corer e coletado o sedimento de cada um dos lanços (Figura 7). Fazendo-se o uso de uma espátula e sacos estéreis, realizou-se a coleta de uma camada de sedimento com cerca de 5 cm de profundidade dentro do amostrador.

Tabela 1 - Locais de amostragem.

LOCAL	LANÇO	ISÓBATA	PROF. REAL (Metros)	LATITUDE	LONGITUDE	AMOSTRA
MOLEQUES	1	25	24	27°50.3535' S	48°28.9910' W	M1A
	2	25	24			M1B
	1	65	66	27°48.9370' S	48°14.7492' W	M2A
	2	65	66			M2B
	1	100	99	27°49.8694' S	48°01.7794' W	M3A
	2	100	99			M3B
GAROPABA	1	20	22	27°59.9675'S	48°34.7093'W	G1A
	2	20	22			G1B
	1	66	65,5	28°00.1060'S	48°32.0600'W	G2A
	2	66	65,5			G2B
	1	100	97	27°59.6256'S	48°04.7156'W	G3A
	2	100	97			G3B

Fonte – Autor (2021).

Ao todo foram coletadas 12 amostras de sedimento marinho, as quais apresentavam camada anóxica de aproximadamente 10 cm, coletados dados de posição geográfica a partir do Sistema de Posicionamento Global (GPS), profundidade e pontos de coleta. As amostras foram

armazenadas em freezer com temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o período de realização do Décimo Sétimo Cruzeiro a bordo LEFCM I.

Figura 6 – Amostragem com box corer.



Fonte: O autor (2019).

Figura 7 – Sedimento coletado em um dos sítios amostrais.



Fonte: O autor (2019).

2.3 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

O DNA total foi extraído utilizando-se o kit comercial “*Power Soil Isolation Kit*” (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções estabelecidas no protocolo do fabricante (Anexo A).

A quantificação da concentração de DNA extraído de cada amostra foi realizada através de um espectrofotômetro “*NanoDrop Lite*” (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts,

EUA) (Tabela 4). A qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v), com tampão TAE 1x a 60 V por 1,5 horas (Figura 8). Após a eletroforese, o gel foi registrado em fotodocumentador com luz UV modelo L-PIX EX (Loccus do Brasil LTDA).

2.4 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

A amplificação do gene RNAr 16S de bactérias foi realizada através da técnica de PCR, segundo (Ovreas et al., 1997). Para avaliar a comunidade microbiana das amostras pela técnica de DGGE utilizou-se os *primers* GC338F e 518R (Quadro 1), os quais amplificam a região variável V3 do gene RNAr 16S de Bacteria, ocasionando um fragmento de aproximadamente 180 pb (Duarte, 2010; Muyzer et al., 1993).

Quadro 1 - Primers utilizados e suas especificações.

Primer	Posição Bases ¹	Região alvo 16S rRNA	Sequência do <i>primer</i>
GC-338F	338-357	<i>Bacteria</i> V3	5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'
518R	518-534	Universal V3	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'

¹ Posição referente à sequência do gene ribossomal RNAr 16S de *Escherichia coli*.

Fonte: Adaptado de Duarte (2010).

Os reagentes utilizados na amplificação eram de concentração 1X tampão PCR 10X, 1 µL de MgCl₂ 50mM, 0,1 µL de Taq 5U polimerase (Platinum Taq polimerase, Invitrogen), 0,25 µL de cada *primer* 20 µM, 0,2 µL de dNTPs 100mM e 15-20 ng de DNA em um volume final de 25 µL de reação. Seguiu-se as condições de amplificação descritas por Duarte (2010), iniciando-se com *hotstart* de 95 °C por 10 minutos; seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 55 °C e 30 segundos de extensão a 72 °C e a extensão final de 72 °C por 10 minutos. Um controle positivo foi preparado a utilizando 25 ng de DNA de *Escherichia coli*. O controle negativo de reação foi preparado substituindo o volume do DNA molde pelo mesmo volume de água MilliQ esterilizada. Todas as amplificações foram realizadas em triplicata em um termociclador Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf, USA). Os produtos de PCR das triplicatas de cada amostra foram misturados entre si para compor um *pool* de DNA amplificado.

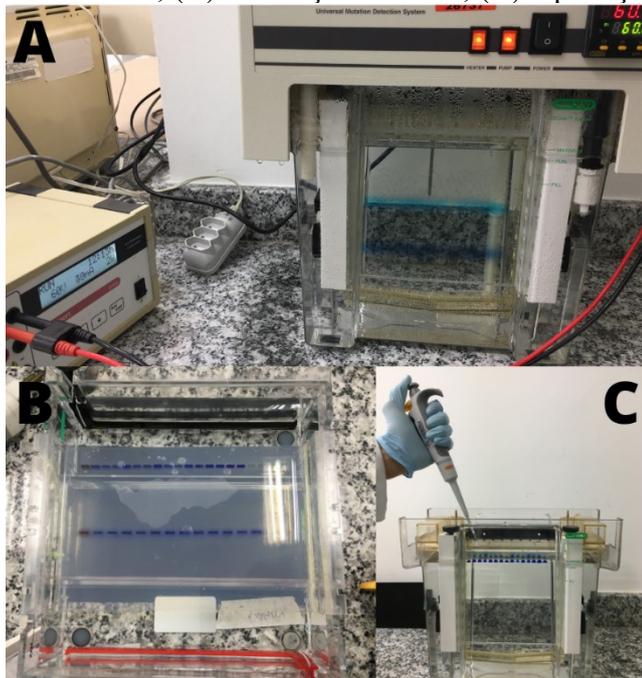
A fim de avaliar a qualidade e integridade dos produtos de PCR, os resultados da amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (g/mL) em TAE 1X a

60 V, corado com Gel Red (Invitrogen), expostos em um transiluminador UV, acoplado a um Sistema de Imagem Digital (fotodocumentador) para gel de eletroforese L-PIX EX (Loccus do Brasil LTDA).

2.5 GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)

Os produtos da amplificação com os *primers* GC338F e 518R das amostras de sedimento marinho foram submetidas a análise por DGGE conforme Muyzer et al. (1993) no sistema “DCode” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os produtos de PCR foram colocados em um gel vertical de poliacrilamida a 10% com gradiente desnaturante de ureia/formamida de 50% - 75%. A eletroforese foi realizada a 60 V, 60 °C, 2 W e 40 mA constantes durante 17h (Figura 8). Em seguida o gel foi corado com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994), e a imagem foi capturada através de fotodocumentador com luz UV modelo L-PIX EX (Loccus do Brasil LTDA).

Figura 8 – (A) Corrida do DGGE; (B) Avaliação da PCR; (C) Aplicação das amostras no gel.



Fonte: O autor (2022).

Os perfis de bandas do DGGE foram processados no software ImageJ (NIH, Estados Unidos) para converter a presença de bandas em um gráfico de curvas densiométricas. Uma

matriz de presença e ausência de bandas foi criada no ImageJ e exportada para o Excel para análises posteriores.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os perfis de bandas do DGGE foram analisados através da matriz de presença e ausência, onde dados como riqueza total (soma do número de bandas presentes), riqueza compartilhada (bandas comuns a todas as amostras) e riqueza exclusiva (bandas únicas de uma amostra). As médias de riqueza das amostras foram comparadas com teste t-Student considerando um valor significativo para $p \leq 0,05$.

A estrutura de comunidade microbiana das amostras de sedimento foi avaliada no software Primer 6.1.16 (Primer-E, Nova Zelândia). Para tal, a partir de uma matriz de similaridade construída com os dados de presença e ausência, aplicando-se o índice de Bray-Curtis. A matriz de similaridade foi utilizada para construir um dendrograma com o método de agrupamento hierárquico pela média (*group average*).

Uma análise multivariada foi aplicada sobre os resultados do DGGE (matriz de presença e ausência) e os dados ambientais (parâmetros físico-químicos) no software Canoco 4.5 (Braak & Smilauer, 2002). Foi empregada uma análise de componentes principais (PCA) com foco de escalonamento entre as amostras de sedimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESULTADOS OBTIDOS EM CAMPO

Durante o embarque realizado a bordo do LEFCM 1 realizou-se a coleta de dados físico-químicos com um CTD – SeaBird 19 plus V2 (Sea-Bird Scientific, Bellevue, WA, USA). A sonda CTD obteve a perfilagem da coluna de água para obtenção de dados de salinidade, temperatura, pressão, fluorescência e oxigênio dissolvido.

Tabela 2 – Dados físico-químicos obtidos por sonda CTD Sea-Bird nos sítios de amostragem.

Amostra	Profundidade (Metros)	Pressão (Pr/M)	Temperatura (°C)	Salinidade	Fluorescência (mg/m ³)	Oxigênio (mg/L)
G1A	19,9732	20,0845	23,77408	32,60046	13,7481	6,99413
G1B	19,9732	20,0845	23,77408	32,60046	13,7481	6,99413
G2A	48,0996	48,3709	24,50031	36,26374	18,16376	6,763171
G2B	48,0996	48,3709	24,50031	36,26374	18,16376	6,763171
G3A	90,0855	90,603	17,80979	35,95109	14,34824	7,648396
G3B	90,0855	90,603	17,80979	35,95109	14,34824	7,648396
M1A	20,2619	20,3748	23,06317	32,43775	17,90191	7,088867
M1B	20,2619	20,3748	23,06317	32,43775	17,90191	7,088867
M2A	53,2173	53,5182	24,39604	36,51576	18,75886	6,765534
M2B	53,2173	53,5182	24,39604	36,51576	18,75886	6,765534
M3A	84,8002	85,2862	17,59945	35,92551	14,4874	7,680464
M3B	84,8002	85,2862	17,59945	35,92551	14,4874	7,680464

Fonte: O autor (2022).

A partir dos sedimentos coletados com o amostrador box corer (Figura 6), realizou-se a análise granulométrica dos sedimentos e o percentual de matéria orgânica presente em cada amostra de primeiro lançamento do amostrador (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise granulométrica e de matéria orgânica para os pontos amostrais.

Amostra	Profundidade (Metros)	MO (%)	Cascalho (%)	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)
G1	22	67,71303	0	99,11	0,8947	0
G2	65	54,07261	0	86,06	13,94	0
G3	97	53,67453	0	82,51	17,49	0
M1	24	62,44882	0	72,18	27,7	0,1176
M2	66	51,35045	0	89,45	10,55	0
M3	98	29,60621	0	97,1	2,9	0

Fonte: O autor (2022).

Com a proximidade dos lançamentos A e B para cada um dos pontos de coleta, somente o lançamento inicial teve feita sua análise granulométrica.

3.2 ESTRUTURA DE COMUNIDADE MICROBIANA

3.2.1 Amplificação do gene RNAr 16S

Os resultados obtidos a partir da PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (g/mL) em TAE 1X a 60 V, corado com Gel Red (Invitrogen). Os géis foram expostos em um transiluminador UV, acoplado a um fotodocumentador L-PIX EX (Loccus do Brasil LTDA) para obtenção das imagens. Após verificar a concentração de cada amostra (Tabela 4), um volume de 5 μ L do DNA extraído foi aplicado em cada canaleta.

A extração de DNA foi efetiva para a maioria das amostras de sedimento, uma vez que a corrida em eletroforese revelou um sinal de banda na altura máxima do padrão de peso molecular utilizado (Figura 9). O sinal nesta posição indica a presença de ácidos nucleicos de tamanho superior a 20 Kbp, ou seja, o conjunto do genoma dos microrganismos da amostra.

Tabela 4 - Concentração de DNA presente em cada amostra.

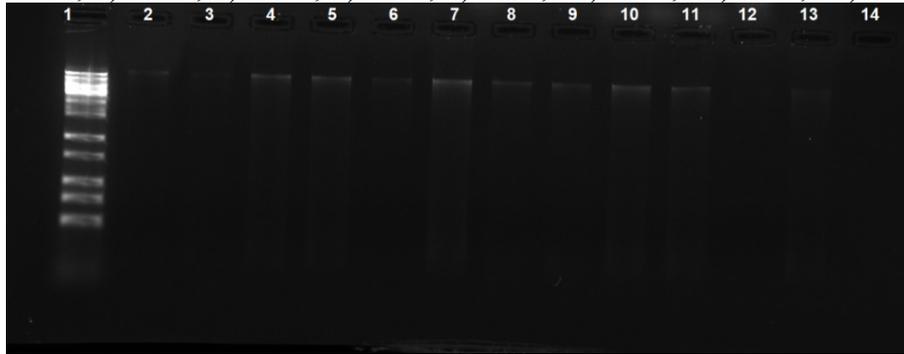
Amostra	Concentração (ng/ μ L)
G1A	6,4
G1B	5,0
G2A	8,1
G2B	7,6
G3A	4,6
G3B	6,8
M1A	4,4
M1B	4,4
M2A	7,9
M2B	8,5
M3A	5,0
M3B	9,7

Fonte: Autor (2022).

As amostras M1B, M3A e G3A apresentaram uma banda com menor intensidade quando comparada às outras amostras, indicando menor quantidade de DNA extraído. Esse

resultado pode indicar variações na eficiência da extração do DNA ou ainda que essas amostras apresentem menor concentração celular no sedimento.

Figura 9 - DNA total das amostras após corrida em eletroforese com gel de agarose 1%. As canaletas indicam: 1) Marcador de peso molecular Ladder 1 Kb (Ludwig); 2) M1A; 3) M1B; 4) M2A; 5) M2B; 6) M3A; 7) M3B; 8) G1A; 9) G1B; 10) G2A; 11) G2B; 12) G3A; 13) G3B.

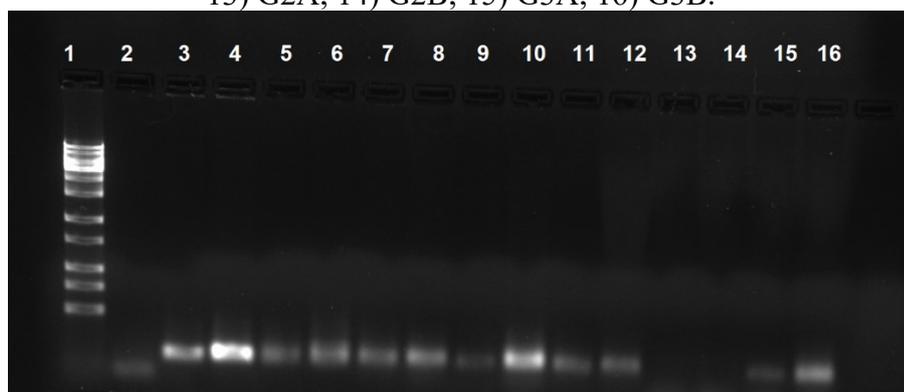


Fonte: O autor (2022).

Todas as amostras foram submetidas à amplificação da região V3 do gene RNAr 16S utilizando os *primers* de DGGE descritos na metodologia. Após a amplificação, o produto de PCR foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando-se 5 μ L em cada canaleta (Figura 10).

A imagem do gel revela a presença de uma banda única para cada amostra, presentes na faixa inferior do gel, indicando uma amplificação com DNA de aproximadamente 180 pb. Observa-se também a presença de um sinal fraco no controle negativo (canaleta 2), porém esse sinal sugere excesso de *primers* da reação.

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% contendo o produto de PCR amplificado com os *primers* de DGGE. As canaletas indicam: 1) Marcador de peso molecular Ladder 1 Kb (Ludwig); 2) Controle negativo (C -); 3) Controle positivo *Escherichia coli* (C+); 4) Controle positivo (C+); 5) M1A; 6) M1B; 7) M2A; 8) M2B; 9) M3A; 10) M3B; 11) G1A; 12) G1B; 13) G2A; 14) G2B; 15) G3A; 16) G3B.



Fonte: O autor (2022).

As amostras G2A (canaleta 13) e G2B (canaleta 14) não apresentaram banda. Esse resultado pode ser explicado por uma baixa concentração de produto da PCR, uma vez que essas amostras apresentaram uma banda de alto peso molecular após a extração (Figura 6, canaletas 10 e 11).

Uma vez que a maioria das amostras apresentaram produto de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de gradiente desnaturante.

3.2.2 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

O DGGE foi realizado a partir do produto de PCR amplificado da região V3 do RNAr 16S, utilizando um gradiente de uréia/formamida entre 50-75%. O gel da eletroforese foi corado com nitrato de prata até a revelação das bandas e a imagem foi registrada em fotodocumentador usando uma luz branca (Figura 11).

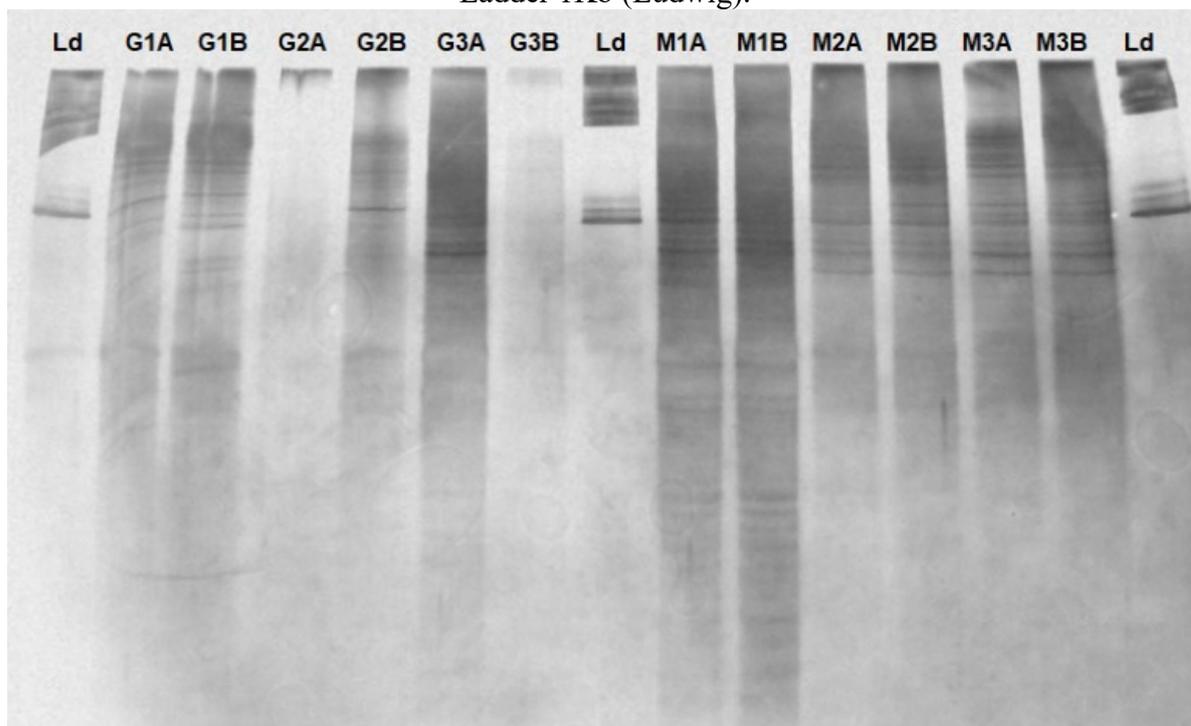
De forma geral, as amostras de sedimento marinho produziram um perfil de bandas composto por DNA contendo diferentes graus de guanina-citosina (G:C). Segundo Muyzer et al. (1993), a interpretação desta técnica é que as bandas representam populações microbianas presentes na amostra, onde cada banda indica uma população diferente. A definição do nível taxonômico dessas populações é incerta, pois isso depende de parâmetros como o par de *primers* utilizados, a região de amplificação, e a própria diversidade da amostra em análise. Dessa forma, neste trabalho será utilizado o termo “filitipo” para indicar uma banda individual em determinada amostra, sendo este um agrupamento de microrganismos que compartilham características genéticas similares no gene RNAr 16S (por exemplo um gênero, uma espécie, ou uma subespécie de bactéria).

Inicialmente observa-se que as amostras G2A e G3B não produziram um perfil de bandas. A amostra G2A não havia apresentado produto de amplificação nas reações de PCR (Figura 7), e isso pode explicar a ausência de perfil de bandas no DGGE. Já a amostra G3B não apresentou bandas por algum erro no preparo das amostras no DGGE, tais como degradação do DNA. Ambas as amostras G2A e G3B foram desconsideradas nas análises posteriores.

Os perfis de bandas do DGGE das amostras de sedimento marinho foram analisados quanto à riqueza e similaridade de filotipos. Para isso, a fotografia do gel foi inicialmente processada no software “*ImageJ*” (NIH, Estados Unidos) a fim de identificar a presença ou ausência de bandas em cada canaleta. Após identificar a localização de cada canaleta, o software transformou a tonalidade dos pixels em uma curva densiométrica, onde cada “pico” representa

a presença de uma banda. Dispondo dos gráficos de intensidade, uma matriz de presença e ausência de filotipos foi criada para permitir a comparação dos perfis das amostras de Garopaba e de Moleques.

Figura 11 - Gel de eletroforese em gradiente desnaturante 50-75% após coloração com nitrato de prata. As canaletas apresentam o perfil de bandas das amostras de Garopaba (G1A até G3B) e Moleques (M1A até M3B). As canaletas Ld contém marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Ludwig).



Fonte: O autor (2022).

3.3 ANÁLISE DA ESTRUTURA DE COMUNIDADE DOS SEDIMENTOS MARINHOS

Um total de 57 diferentes filotipos foram encontrados entre todas as amostras, sendo 6 filotipos encontrados em todos os sedimentos. Este resultado sugere que cerca de 10,5% dos microrganismos estudados (6 de um total de 57 filotipos) são adaptados a viver em diferentes profundidades tanto em Garopaba quanto em Moleques. Por outro lado, 4 filotipos estavam presentes em apenas uma das amostras, 1 em M3A e 3 em M3B, demonstrando que há microrganismos que tem alta adaptação a certos ambientes ou profundidades, ou ainda que possuem dispersão limitada no sedimento marinho.

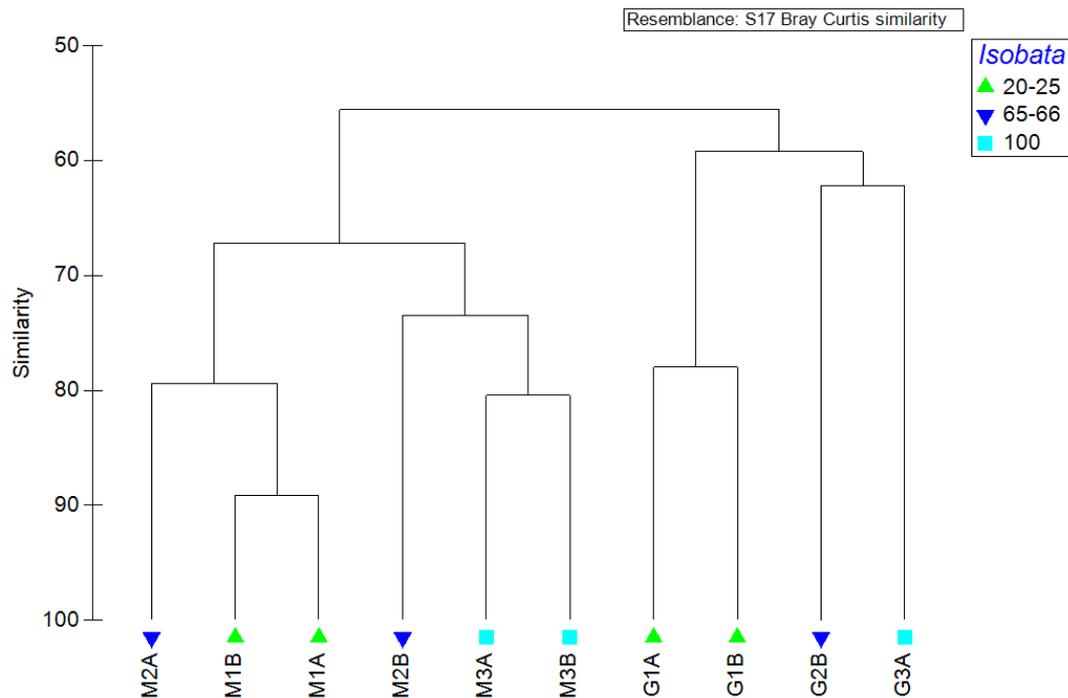
Em termos de riqueza de filotipos, os sedimentos de Garopaba apresentaram uma média de 21,5 ($\pm 3,2$) filotipos, enquanto os sedimentos de Moleques revelaram uma média de

37,3 ($\pm 4,1$) filotipos. O resultado indica que os sedimentos de Moleques possuem uma riqueza de bactérias maior que o sedimento de Garopaba ($p = 0.000398$).

O efeito da profundidade sobre a distribuição dos microrganismos também foi revelado pelo DGGE, que não ocorre uma tendência de aumento de espécies em relação ao aumento da profundidade da amostra, a influência é o ambiente em que a comunidade está inserida.

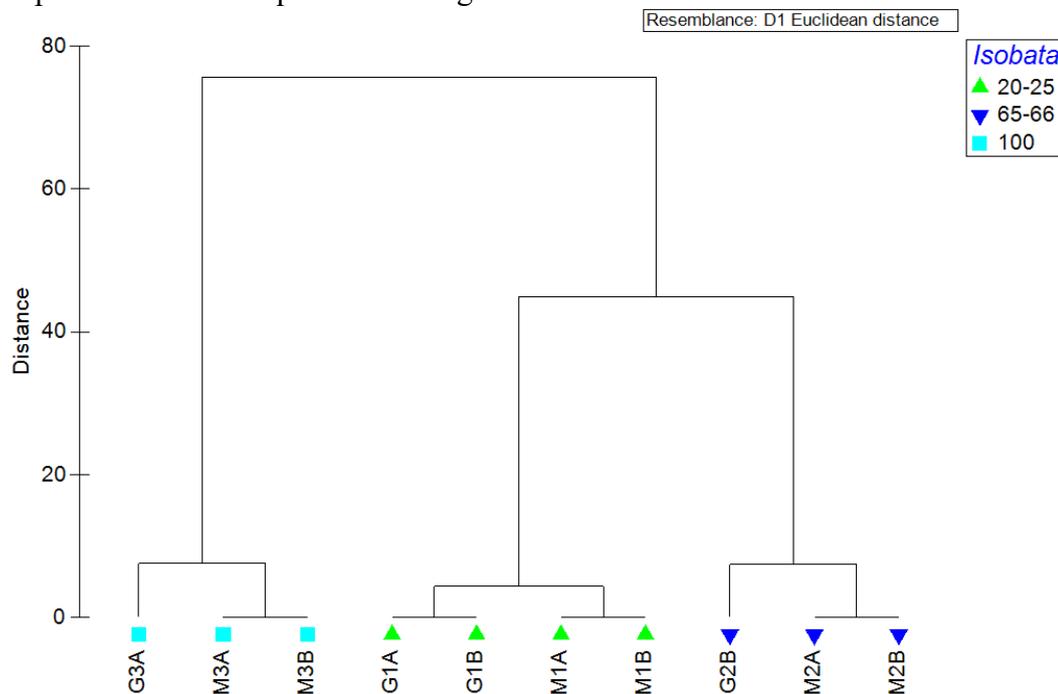
Para caracterizar a similaridade de cada ambiente, a matriz de presença e ausência e os conjuntos de dados físico-químicos foram analisados no software “*Primer 6*” (Primer-e, Auckland, NZ). Um dendrograma de similaridade para os dados biológicos (Figura 12) e outro para os parâmetros físico-químicos (Figura 13) foram criados.

Figura 12 - Dendrograma de similaridade Bray-Curtis das amostras de sedimento de Garopaba (G1A, G1B, G2B, G3A) e Moleques (M1A, M1B, M2A, M2B, M3A e M3B) em termos de presença e ausência de filotipos. A legenda indica a isóbata da amostra em metros.



Fonte: O autor (2022).

Figura 13 - Dendrograma de distância Euclidiana das amostras de sedimento de Garopaba (G1A, G1B, G2B, G3A) e Moleques (M1A, M1B, M2A, M2B, M3A e M3B) em termos dos parâmetros físico-químicos. A legenda indica a isóbata da amostra em metros.



Fonte: O autor (2022).

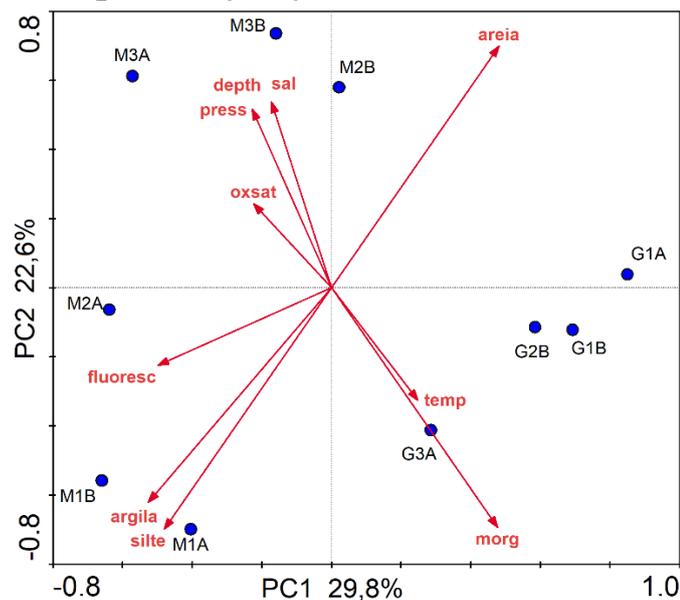
O dendrograma dos dados biológicos (Figura 12) separou os conjuntos amostrais por ambientes, onde as amostras de Moleques ficaram em um ramo distinto das amostras de Garopaba. Identificou-se que Garopaba e Moleques possuem um grau de similaridade de 55,62%, enquanto que o conjunto de amostras de Moleques entre si possui 67,24% de similaridade e nas amostras de Garopaba este grau de similaridade é de 59,28%. As amostras de M1A e M1B possuem o maior grau de similaridade (89,19%) de toda a análise, possivelmente em decorrência de sua proximidade amostral. Dentro de cada agrupamento de amostras observa-se um sub-agrupamento dos sedimentos quanto à profundidade de coleta (isóbata). Por exemplo, sedimentos de isóbatas similares foram agrupados entre si como M1A-M1B, G1A-G1B e M3A-M3B. As amostras de sedimento de isóbatas intermediárias como G2B, M2A e M2B não apresentaram esse padrão, sugerindo que essa profundidade atue como um ambiente de transição para as comunidades microbianas.

O dendrograma dos dados físico-químicos (Figura 13) claramente agrupou as amostras por profundidade, onde sedimentos rasos, médios e mais profundos ficaram agrupados respectivamente entre si, não importando a área de coleta. Por exemplo, sedimentos rasos de Garopaba (G1A-G1B) apresentaram similaridade de 95,76% com sedimentos rasos de Moleques (M1A-M1B). Esse resultado também pode ser observado para os sedimentos

intermediários (G2B, M2A, M2B) com 92,71% e para os sedimentos profundos (G3A, M3A, M3B) com 92,5%. Este resultado indica que, diferentemente dos dados biológicos, os fatores físico-químicos são mais influenciados pela profundidade que o sedimento se encontra, e não à localização geográfica.

A fim de melhor compreender a influência dos parâmetros físico-químicos sobre a estrutura de comunidade microbiana dos sedimentos, uma análise multivariada PCA (Principal Components Analysis) foi realizada utilizando o software Canoco 4.5 (swMath, Alemanha) (Figura 14).

Figura 14 - Análise de componentes principais (PCA) entre os dados biológicos obtidos no DGGE e os parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento. Os círculos azuis indicam as amostras de Garopaba (G1A até G3A) e Moleques (M1A até M3B). As legendas dos vetores representam a temperatura (temp), fluorescência (fluoresc), saturação de oxigênio (oxsat), profundidade (depth), pressão (press), salinidade (sal), matéria orgânica (morg) e a espessura do sedimento (argila, silte e areia). Os vetores press e depth ficaram sobrepostos entre si. A porcentagem de explicação da PC1 foi 29,8% e da PC2 foi 22,6%.



Fonte: O autor (2022).

A análise de PCA revelou um agrupamento das amostras por área de coleta, no qual a componente principal PC1 separou as amostras de Garopaba no setor direito do gráfico, enquanto as amostras de Moleques ficaram agrupadas no setor esquerdo. A componente principal PC2 separou as amostras de Moleques com relação à profundidade, salinidade e pressão, dispondo as amostras M1A-M1B e M2A no setor inferior esquerdo, enquanto as amostras M2B, M3A e M3B ficaram no setor superior esquerdo. Essa estruturação corroborou com os resultados anteriores do dendrograma de dados biológicos (Figura 12). Cabe ressaltar

que as variáveis de profundidade, salinidade e pressão são fatores que estão diretamente relacionados entre si, portanto apresentaram um resultado similar na PCA.

As amostras de Garopaba apresentaram a temperatura e a matéria orgânica como variáveis explicativas mais fortes, enquanto os sedimentos mais rasos de Moleques apresentaram a fluorescência juntamente com sedimentos de granulometria menor que 0,05 mm (argila e silte), e os sedimentos mais profundos de Moleques tiveram a pressão, salinidade, profundidade e saturação de oxigênio como maior influência.

Este trabalho é pioneiro, já que não há registros de estudos que aplicaram metodologia similar nas profundidades escolhidas, na costa brasileira e correlacionando tantos dados físico-químicos. Os estudos que mais se assemelham a este, são estudos aplicados na região da Antártida por Franco (2014) e em São Paulo por Moraes (2012).

Para Franco (2014), a distribuição das comunidades microbianas não sofreu influência com a mudança de profundidade ao longo da área de estudo. Além disso, os autores determinaram que estrutura de comunidade em profundidades menores e mais próximas (100m, 300m, 500m) eram diferentes das comunidades mais profundas (700m e 1000m).

Para Moraes (2012), diferentes grupos de organismos têm sua dominância associada a sua adaptabilidade a determinadas características físico-químicas, como densidade, temperatura, carbono e clorofila. Outro ponto discutido em seu texto, discorre que eventos pontuais de ressuspensão ou de enriquecimento orgânico podem afetar a comunidade bacteriana ali presente. A autora conclui expondo como a descrição filogenética da diversidade bacteriana permanece incompleta e que os estudos no Brasil ainda são muito escassos e se concentram principalmente na coluna d'água e manguezais, ocasionando um limitante na comparação de estudos.

No presente trabalho é impossível afirmar sobre a sobrevivência e adaptabilidade dos organismos sobre os ambientes. Em decorrência da coleta ter ocorrido no período de inverno, as comunidades podem ter sofrido influência da chegada de nutrientes oriundos da pluma do Prata e da presença de massas d'água como a ACAS em baixas profundidades, a produção primária associada a uma baixa profundidade pode ser influência do impacto antrópico ou evento de ressuspensão recente.

No estudo de Gray & Herwig (1996), os autores sugeriram que os estudos futuros de ecologia microbiana no sedimento marinho deveriam ter seus dados filogenéticos associados as atividades microbianas, geoquímica dos sedimentos e outros fatores da oceanografia bentônica.

4 CONCLUSÃO

A análise dos diversos resultados deste trabalho permitiu concluir que a distribuição e a estrutura das comunidades microbianas não estão somente ligadas as diferentes profundidades, mas aos fatores físico-químicos associados a água e a adaptabilidade dos organismos ao ambiente.

A estrutura da comunidade é muito rica e diversa, apresentou um total de 57 filotipos, 6 adaptados a todos os ambientes e outros 4 exclusivos dos dois pontos mais profundos de Moleques.

A comunidade microbiana de Moleques possui uma riqueza maior que a de Garopaba, entretanto, visto que não ocorre uma tendência de aumento de filotipos com o aumento da profundidade da amostra, a influência é o ambiente em que a comunidade está inserida.

Ressaltasse que em estudos com o uso das técnicas aplicadas no trabalho, pode ocorrer a presença de DNA de organismos já mortos que se faziam presentes no ponto amostral.

Para os sedimentos de Garopaba o parâmetro que se mostrou mais importante foi a temperatura, favorecendo organismos que melhor se adaptam a este parâmetro.

Uma vez que as comunidades bacterianas são selecionadas basicamente por suas estratégias de sobrevivência, as condições ambientais existentes em cada profundidade, servem como limitantes, sendo assim comunidades de profundidades mais rasas possuem características distintas das que estão em grandes profundidades; e aquelas que estão em profundidades intermediárias, por serem regiões de transição, possuem características similares as regiões rasas e fundas.

A partir dos resultados obtidos, recomenda-se a continuidade dos estudos em diferentes estações do ano, a realização de cultivos e isolamento das comunidades bacterianas visando uma possível aplicação biotecnológica e a realização de outros géis em gradiente desnaturante, o sequenciamento metagenômico para a identificação dos organismos presentes em cada comunidade e compreender sobre sua adaptabilidade ao ambiente.

5 REFERÊNCIAS

- BOLLIGER, R.; HANSELMANN, K.W. & BACHOFEN, R. 1991. Microbial potential in deep-sea sediments. *Experientia*, 47: 517-523.
- BOTT, T.L. & KAPLAN, L.A. 1990. Potential for Protozoan Grazing of Bacteria in Streambed Sediments. *Journal of the North American Benthological Society*, 9: 336-345.
- BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)**. Ithaca: Microcomputer Power. 2002. 500 p.
- CARVALHO, KDC; PARANHOS, Rodolfo. Análise de abundância bacteriana no estudo da ecologia microbiana de sedimentos marinhos. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 2, p. 415-436, 2010.
- CASTRO FILHO, BM de. Estado atual do conhecimento dos processos físicos das águas da plataforma continental sudeste do Brasil. II Simpósio de Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira, Aguas de Lindoia, SP. **Academia de Ciências**, v. 1, p. 1-19, 1990.
- CASTRO, BM de. Correntes e massas de água da plataforma continental norte de São Paulo. **Livre-Docente Thesis, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo**, 1996.
- CASTRO, BM de; MIRANDA, LB de. Physical oceanography of the western Atlantic continental shelf located between 4 N and 34 S. **The sea**, v. 11, n. 1, p. 209-251, 1998.
- CECHINEL, Karen Cancellier. Caracterização físico-química e oceanográfica da Plataforma Continental Interna de Santa Catarina: Subsídio para a gestão da pesca da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). 2015.
- COCK JM, Tessmar-Raible K, Boyen C, Viard F. 2010. Introduction to Marine Genomics, *Advances in Marine Genomics 1*. Springer, Dordrecht, 399 pp.
- DANOVARO, Roberto et al. Deep-sea nematode biodiversity in the Mediterranean basin: testing for longitudinal, bathymetric and energetic gradients. **Ecography**, v. 31, n. 2, p. 231-244, 2008.
- DE ABREU, Érika Ferreira. Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbio. 2014.
- DUARTE, Rubens Tadeu Delgado. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e permafrost polares**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FRANCO, Diego Armando Castillo. **Estudo da diversidade molecular de bactérias e arqueias e enriquecimento de comunidades metanogênicas em sedimentos marinhos antárticos**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GAGE, J.D. & TYLER, P.A. 1991. Deep-Sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep Sea Floor. Cambridge University Press, Cambridge, CB. 504p.

GAGE, J.D. 2003. Food inputs, utilization, carbon flow and energetics. Pp. 313-380. In: P.A. Tyler (ed.). Ecosystems of the deep oceans. Elsevier, Amsterdam, SA. 582p.

GIOVANNONI, Stephen J. SAR11 bacteria: the most abundant plankton in the oceans. **Annual review of marine science**, v. 9, p. 231-255, 2017.

GRAY, James P.; HERWIG, Russell P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4049-4059, 1996.

HARPER, J. L.; HAWKSWORTH, D. L. Preface. In: HAWKSWORTH, D.L. Biodiversity, Measurement and Estimation. **Philos. Trans. R. Soc. LOND. B. Biol. Sci.**, v. 29, n. 45 p. 5-12, 1994.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MORAES, Paula Carpintero de. **Resposta microbiana a perturbações naturais em sedimentos costeiros**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MUYZER, Gerard; DE WAAL, Ellen C.; UITTERLINDEN, Andre G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

OVREÅS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

PARKES, R.J.; CRAGG, B.A.; BALE, S.J.; GETLIFF, J.M.; GOODMAN, K.; ROCHELLE, P.A. FRY, J.C.; WEIGHTMAN, A.J. & HARVEY, S.M. 1994. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature*, 371: 410-413.

PEREIRA, Marçal Duarte; SCHETTINI, Carlos Augusto França; OMACHI, Claudia Yuki. Caracterização de feições oceanográficas na plataforma de Santa Catarina através de imagens orbitais. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 27, p. 81-93, 2009.

PINET, P.R. 2014. Invitation To Oceanography. 7ª edição. Jones & Bartlett Learning. 662 p.

REX, M.A.; ETTER, R.J.; MORRIS, J.S.; CROUSE, J.; MCCLAIN, C.R.; JOHNSON, N.A.; STUART, C.T.; DEMING, J.W.; THIES, R. & AVERY, R. 2006. Global bathymetric patterns of standing stock and body size in the deep-sea benthos. *Marine Ecology Progress Series*, 317: 1-8.

SAKAMOTO, Isabel Kimiko; VAZOLLER, Rosana Filomena. **Comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica do fósforo em excesso, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**. 2001.

SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia**: manual de aulas práticas. Florianópolis: UFSC, 2004.56p.

SMITH, K.L.JR.; KAUFMANN, R.S.; BALDWIN, R.J. & CARLUCCI, A.F. 2001. Pelagic-benthic coupling in the abyssal eastern North Pacific: an 8-year time-series study of food supply and demand. *Limnology and Oceanography*, 46: 543-556.

SOARES-GOMES, Abilio; FIGUEIREDO, Alberto Garcia. O ambiente marinho. **Biologia marinha**, v. 1, p. 1-33, 2002.

STALEY, James T.; KONOPKA, Allan. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual review of microbiology**, v. 39, n. 1, p. 321-346, 1985.

Stat, M.; Huggett, M. J.; Bernasconi, R.; DiBattista, J. D.; Berry, T. E.; Newman, S. J.; Harvey, E. S. & Bunce, M. 2020. Divergence from a common ancestor. https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Divergence_from_a_common_ancestor.png acessado em 03/08/2022.

Towiki60, 2009. PlataformaContinental. https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Plataforma_continental1.jpg acessado em 03/08/2022.

TESSLER, M. G & MAHIQUES, M.M. de. Processos oceânicos e a fisiografia dos fundos marinhos. IN: TEIXEIRA, W. et al. *Decifrando a Terra*. São Paulo, Oficina de Textos, 2000. 568p. Il. p. 261-284. il.

ANEXO A – PowerSoil DNA Isolation Kit



PowerSoil™ DNA Isolation Kit

Catalog No.	Quantity
12888-50	50 Preps
12888-100	100 Preps

Instruction Manual

Introduction

The PowerSoil™ DNA Isolation Kit* is comprised of a novel and proprietary method for isolating genomic DNA from environmental samples. The kit is intended for use with environmental samples containing a high humic acid content including difficult soil types such as compost, sediment, and manure. Other more common soil types have also been used successfully with this kit. The isolated DNA has a high level of purity allowing for more successful PCR amplification of organisms from the sample. PCR analysis has been performed to detect a variety of organisms including bacteria (e.g. *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*), fungi (e.g. yeasts, molds), algae and Actinomycetes (e.g. *Streptomyces*).

The PowerSoil™ DNA Isolation Kit distinguishes itself from MO BIO's UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit with a **NEW** humic substance/brown color removal procedure. This new procedure is effective at removing PCR inhibitors from even the most difficult soil types.

Environmental samples are added to a bead beating tube for rapid and thorough homogenization. Cell lysis occurs by mechanical and chemical methods. Total genomic DNA is captured on a silica membrane in a spin column format. DNA is then washed and eluted from the membrane. DNA is then ready for PCR analysis and other downstream applications.

This kit is for research purposes only. Not for diagnostic use.

***PATENT PENDING**

Version: 05182007

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com

**Required Equipment:**

Microcentrifuge (10,000 x g)
 Pipettors (50 μ l - 500 μ l)
 Vortex
 Vortex Adapter (MO BIO Catalog # 13000-V1)

Kit Contents

Component	Kit Catalog # 12888-50		Kit Catalog # 12888-100	
	Catalog #	Amount	Catalog #	Amount
PowerBead Tubes (contain 750 μ l solution)	12888-50-PBT	50	12888-100-PBT	100
PowerSoil Solution C1	12888-50-1	3.3 ml	12888-100-1	6.6 ml
PowerSoil Solution C2	12888-50-2	14 ml	12888-100-2	28 ml
PowerSoil Solution C3	12888-50-3	11 ml	12888-100-3	22 ml
PowerSoil Solution C4	12888-50-4	72 ml	12888-100-4	144 ml
PowerSoil Solution C5	12888-50-5	30 ml	12888-100-5	2 x 30 ml
PowerSoil Solution C6	12888-50-6	6 ml	12888-100-6	12 ml
PowerSoil Spin Filters (units in 2 ml tubes)	12888-50-SF	50	12888-100-SF	100
PowerSoil 2 ml Collection Tubes	12888-50-T	200	12888-100-T	400

Kit Storage

Kit reagents and components should be stored at room temperature (15-30°C).

Precautions

Please wear gloves when using this product. Avoid all skin contact with kit reagents. In case of contact, wash thoroughly with water. Do not ingest. See Material Safety Data Sheets for emergency procedures in case of accidental ingestion or contact. All MSDS information is available upon request (760-929-9911) or at www.mobio.com. Reagents labeled flammable should be kept away from open flames and sparks.

WARNING: Solution C5 contains ethanol. It is flammable.

IMPORTANT NOTE FOR USE: Make sure the 2 ml PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com



Experienced User Protocol
Please wear gloves at all times

1. To the PowerBead Tubes provided, add 0.25 gm of soil sample.
2. Gently vortex to mix.
3. **Check Solution C1.** If Solution C1 is precipitated, heat solution to 60°C until dissolved before use.
4. Add 60µl of Solution C1 and invert several times or vortex briefly.
5. Secure PowerBead Tubes horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog No. 13000-V1) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes.
6. Make sure the PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. **CAUTION:** Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.
7. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
Note: Expect between 400 to 500µl of supernatant. Supernatant may still contain some soil particles.
8. Add 250µl of Solution C2 and vortex for 5 seconds. Incubate at 4°C for 5 minutes.
9. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
10. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 600µl of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
11. Add 200µl of Solution C3 and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.
12. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
13. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 750µl of supernatant into a clean 2 ml Collection Tube (provided).
14. Add 1200µl of Solution C4 to the supernatant and vortex for 5 seconds.
15. Load approximately 675µl onto a Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Discard the flow through and add an additional 675µl of supernatant to the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Load the remaining supernatant onto the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. **Note:** A total of three loads for each sample processed are required.
16. Add 500µl of Solution C5 and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.
17. Discard the flow through.
18. Centrifuge again at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
19. Carefully place Spin Filter in a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any Solution C5 onto the Spin Filter.
20. Add 100µl of Solution C6 to the center of the white filter membrane. Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog No. 17000-10).
21. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.
22. Discard the Spin Filter. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20° to -80°C). Solution C6 contains no EDTA. To concentrate the DNA see the Additional Information Section.

Thank you for choosing the PowerSoil™ DNA Isolation Kit.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mbio.com



Detailed Protocol

Please wear gloves at all times

1. To the PowerBead Tubes provided, add 0.25 gm of soil sample.

After your sample has been loaded into the PowerBead Tube, the next step is a homogenization and lysis procedure. The PowerBead Tube contains a buffer that will (a) help disperse the soil particles, (b) begin to dissolve humic acids and (c) protect nucleic acids from degradation.

2. Gently vortex to mix.

Gentle vortexing mixes the components in the PowerBead Tube and begins to disperse the sample in the PowerBead Solution.

3. **Check Solution C1.** If Solution C1 is precipitated, heat solution to 60°C until the precipitate has dissolved before use.

Solution C1 contains SDS and other disruption agents required for complete cell lysis. In addition to aiding in cell lysis, SDS is an anionic detergent that breaks down fatty acids and lipids associated with the cell membrane of several organisms. If it gets cold, it will form a white precipitate in the bottle. Heating to 60°C will dissolve the SDS and will not harm the SDS or the other disruption agents. Solution C1 can be used while it is still warm.

4. Add 60µl of Solution C1 and invert several times or vortex briefly.

5. Secure PowerBead Tubes horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog No. 13000-V1) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes.

Note: *The vortexing step is critical for complete homogenization and cell lysis. Cells are lysed by a combination of chemical agents from steps 1-4 and mechanical shaking introduced at this step. By randomly shaking the beads in the presence of disruption agents, collision of the beads with microbial cells will cause the cells to break open.*

The MO BIO Vortex Adapter is designed to be a simple platform to facilitate keeping the tubes tightly attached to the vortex. It should be noted that although you can attach tubes with tape, often the tape becomes loose and not all tubes will shake evenly or efficiently. This may lead to inconsistent results or lower yields. Therefore, the use of the MO BIO Vortex Adapter is a highly recommended and cost effective way to obtain maximum DNA yields.

6. Make sure the PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. **CAUTION:** Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.

7. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

Note: *Expect between 400 to 500µl of supernatant at this step. The exact recovered volume depends on the absorbency of your starting material and is not critical for the procedure to be effective. The supernatant may be dark in appearance and still contain some soil particles. The presence of carry over soil or a dark color in the mixture is expected in many soil types at this step. Subsequent steps in the protocol will remove both carry over soil and coloration of the mixture.*

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mbio.com



8. Add 250µl of Solution C2 and vortex for 5 seconds. Incubate at 4°C for 5 minutes.

Solution C2 contains a reagent to precipitate non-DNA organic and inorganic material including humic substances, cell debris, and proteins. It is important to remove contaminating organic and inorganic matter that may reduce DNA purity and inhibit downstream DNA applications.

9. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

10. Avoiding the pellet, transfer up to 600µl of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

The pellet at this point contains non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. For the best DNA yields, and quality, avoid transferring any of the pellet.

11. Add 200µl of Solution C3 and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.

Solution C3 is a second reagent to precipitate additional non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. It is important to remove contaminating organic and inorganic matter that may reduce DNA purity and inhibit downstream DNA applications.

12. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

13. Transfer up to 750µl of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

The pellet at this point contains additional non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. For the best DNA yields, and quality, avoid transferring any of the pellet.

14. Add 1.2ml of Solution C4 to the supernatant (be careful solution doesn't exceed rim of tube) and vortex for 5 seconds.

Solution C4 is a high concentration salt solution. Since DNA binds tightly to silica at high salt concentrations, this will adjust the DNA solution salt concentrations to allow binding of DNA, but not non-DNA organic and inorganic material that may still be present at low levels, to the Spin Filters.

15. Load approximately 675µl onto a Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Discard the flow through and add an additional 675µl of supernatant to the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Load the remaining supernatant onto the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. **Note:** A total of three loads for each sample processed are required.

DNA is selectively bound to the silica membrane in the Spin Filter device in the high salt solution. Contaminants pass through the filter membrane, leaving only DNA bound to the membrane.

16. Add 500µl of Solution C5 and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.

Solution C5 is an ethanol based wash solution used to further clean the DNA that is bound to the silica filter membrane in the Spin Filter. This wash solution removes residual salt, humic acid, and other contaminants while allowing the DNA to stay bound to the silica membrane.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mbio.com



17. Discard the flow through from the 2 ml Collection tube.

This flow through fraction is just non-DNA organic and inorganic waste removed from the silica Spin Filter membrane by the ethanol wash solution.

18. Centrifuge at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

This second spin removes residual Solution C5 (ethanol wash solution). It is critical to remove all traces of wash solution because the ethanol in Solution C5 can interfere with many downstream DNA applications such as PCR, restriction digests, and gel electrophoresis.

19. Carefully place Spin Filter in a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any Solution C5 onto the Spin Filter.

Note: *It is important to avoid any traces of the ethanol based wash solution.*

20. Add 100µl of Solution C6 to the center of the white filter membrane.

Note: *Placing the Solution C6 (sterile elution buffer) in the center of the small white membrane will make sure the entire membrane is wetted. This will result in a more efficient and complete release of the DNA from the silica Spin Filter membrane. As Solution C6 (elution buffer) passes through the silica membrane, DNA that was bound in the presence of high salt is selectively released by Solution C6 (10 mM Tris) which lacks salt*

Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for DNA elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog No. 17000-10). Solution C6 contains no EDTA. If DNA degradation is a concern, Sterile TE may also be used instead of Solution C6 for elution of DNA from the Spin Filter.

21. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.

22. Discard the Spin Filter. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20° to -80°C). Solution C6 does not contain any EDTA. To concentrate DNA see the Additional Information Section.

Thank you for choosing the PowerSoil™ DNA Isolation Kit.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com



Additional Information

Amount of Soil to Process

This kit is designed to process 0.25 g of soil. For inquiries regarding the use of larger sample amounts, please contact technical support for suggestions. For wet soils, see information under "Wet Soil Sample" below.

Wet Soil Sample

If soil sample is high in water content, remove contents from PowerBead Tube (beads and solution) and transfer into another sterile microcentrifuge tube (not provided). Add soil sample to PowerBead Tube and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g. Remove as much liquid as possible with a pipet tip. Add beads and bead solution back to PowerBead Tube and follow protocol starting at step 2.

If DNA Does Not Amplify

- Make sure to check DNA yields by gel electrophoresis or spectrophotometer reading. An excess amount of DNA will inhibit a PCR reaction.
- Diluting the template DNA should not be necessary with DNA isolated with the PowerSoil DNA Isolation Kit; however, it should still be attempted.
- If DNA will still not amplify after trying the steps above, then PCR optimization (changing reaction conditions and primer choice) may be needed.

Eluted DNA Sample Is Brown

We have not observed any coloration in DNAs isolated using the PowerSoil DNA Isolation kit. If you observe coloration in your samples, please contact technical support for suggestions.

Alternative Lysis Methods

- After adding Solution C1, vortex 3-4 seconds, then heat to 70°C for 5 minutes. Vortex 3-4 seconds. Heat another 5 minutes. Vortex 3-4 seconds. This alternative procedure will reduce shearing but may also reduce yield.
- If cells are difficult to lyse, a 10 minute incubation at 70°C, after adding Solution C1, can be performed. Follow by continuing with protocol step 5.

Concentrating the DNA

The final volume of eluted DNA will be 100µl. The DNA may be concentrated by adding 4µl of 5M NaCl and inverting 3-5 times to mix. Next, add 200µl of 100% cold ethanol and invert 3-5 times to mix. Centrifuge at 10,000 x g for 5 minutes at room temperature. Decant all liquid. Remove residual ethanol in a speed vac, dessicator, or air dry. Resuspend precipitated DNA in sterile water or sterile 10 mM Tris.

DNA Floats Out of Well When Loaded on a Gel

This usually occurs because residual Solution C5 remains in the final sample. Prevent this by being careful in step 19 not to transfer liquid onto the bottom of the spin filter basket. Ethanol precipitation (described in "Concentrating the DNA") is the best way to remove residual Solution C5.

Storing DNA

DNA is eluted in Solution C6 (10mM Tris) and must be stored at -20° to -80°C to prevent degradation. DNA can be eluted in TE without loss, but the EDTA may inhibit downstream reactions such as PCR and automated sequencing. DNA may also be eluted with sterile DNA-Free PCR Grade Water (MO BIO Catalog No. 17000-10).

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com



Other Quality Products Available from MO BIO Laboratories, Inc.

<u>Product Description</u>	<u>Catalog No.</u>
DNA Isolation Kits	
UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (50 preps)	12800-50
UltraClean™ Mega Soil DNA Isolation Kit (10 preps)	12900-10
UltraClean-htp™ 96 Well Soil DNA Isolation Kit (4 x 96 preps)	12896-4
UltraClean™ Fecal DNA Isolation Kit (50 preps)	12811-50
UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (50 preps)	12224-50
RNA Isolation Kits	
UltraClean™ Microbial RNA Isolation Kit (50 preps)	15800-50
DNA Purification Kits	
UltraClean™ 15 DNA Purification Kit (300 preps)	12100-300
UltraClean™ GelSpin™ DNA Extraction Kit (100 preps)	12400-100
UltraClean™ PCR Clean-Up Kit (100 preps)	12500-100

Contact Information

Phone MO BIO Laboratories, Inc. Toll Free 800-606-6246, or 760-929-9911
 Email: technical@mobio.com
 Fax: 760-929-0109
 Mail: MO BIO Laboratories, Inc, 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010

Ordering Information
 Direct: Phone MO BIO Laboratories, Inc. Toll Free 800-606-6246, or 760-929-9911
 Email: orders@mobio.com
 Fax: 760-929-0109
 Mail: MO BIO Laboratories, Inc, 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010

For the distributor nearest you, visit our web site at www.mobio.com/distributors

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com