

Análise de Perfis de Ácidos Graxos como Ferramenta para Estudos em Microbiologia do Solo



Documentos 163

Análise de Perfis de Ácidos Graxos como Ferramenta para Estudos em Microbiologia do Solo

Marcelo Ferreira Fernandes
Guilherme M. Chaer

Aracaju, SE
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Av. Beira-mar, 3250, Caixa Postal 44, CEP 49001-970,
Aracaju, SE

Tel (0**79) 4009-1300

Fax (0**79) 4009-1369

E-mail: sac@cpatc.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Ronaldo Souza Resende*

Secretária-Executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Edson Patto Pacheco, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Ivênio Rubens de Oliveira, Joézio Luiz dos Anjos, Josué Francisco da Silva Junior, Luciana Marques de Carvalho, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos, Viviane Talamini*

Supervisão editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Normalização bibliográfica: *Josete Melo Cunha*

Tratamento das ilustrações: *Nathalie de Góis Paula*

Foto da capa: *Marcelo Ferreira Fernandes*

Editoração eletrônica: *Nathalie de Góis Paula*

1ª Edição

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Fernandes, Marcelo Ferreira

Análise de perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo / Marcelo Ferreira Fernandes, Guilherme M. Chaer – Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010. 37 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 163). Disponível em

http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_163.pdf

1. Solo. 2. Microorganismo. 3. Ácido graxo. 4. Composição do solo. I. Chaer, Guilherme M. II. Título. IV. Série.

CDD 631.4

©Embrapa 2010

Autores

Marcelo Ferreira Fernandes

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Ciência do Solo,
Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros,
Aracaju-SE, marcelo@cpatc.embrapa.br.

Guilherme M. Chaer

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Ciência do solo,
Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ,
gchaer@cnpab.embrapa.br

Apresentação

Os microrganismos do solo participam na regulação de um grande número de processos de importância ambiental e econômica, como a ciclagem de nutrientes, a agregação do solo, o balanço de gases de efeito estufa entre a litosfera e a atmosfera, a degradação de compostos xenobióticos, dentre outros. Com a percepção de que o controle destes processos ocorre por interações complexas entre diferentes taxa microbianos, há, atualmente, um consenso sobre a necessidade de se adotar as comunidades microbianas como as unidades básicas nas investigações de ecologia.

Os primeiros estudos sobre a função e a composição das comunidades microbianas em amostras ambientais baseavam-se no isolamento e na caracterização de membros cultiváveis destas comunidades. Além de não permitirem a adequada representação da comunidade microbiana total, dada à baixa culturabilidade dos organismos de amostras ambientais, estes procedimentos são extremamente laboriosos, de modo que apenas uma reduzida subamostra dos organismos obtidos pelas técnicas de plaqueamento são efetivamente investigadas nestes estudos.

Várias alternativas de investigação de comunidades microbianas, as quais independem de isolamento e cultivo, têm sido propostas para contornar esses problemas. Dentre estas, as mais utilizadas são baseadas em análises de polimorfismo de regiões do DNA amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), os perfis de fisiológicos em nível de comunidade (CLPP) e os perfis de ácidos graxos obtidos a partir de lipídios extraídos da microbiota do solo.

Esta publicação dedica-se especificamente à apresentação e discussão de aspectos pertinentes ao uso de ácidos graxos para o estudo de comunidades microbianas do solo.

Edson Diogo Tavares

Chefe-geral da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Sumário

Química e origem microbiana de ácidos graxos.....	7
Métodos de extração.....	11
Ácidos Graxos de Fosfolipídios (PLFA).....	11
Ácidos Graxos de Ligação Éster (EL-FA).....	13
Ácidos Graxos Totais Extraíveis pelo Procedimento Comercial MIDI® (MIDIFA).....	14
Usos	
Estrutura da comunidade microbiana.....	16
Índices de Diversidade Microbiana.....	22
Biomassa Microbiana.....	23
Relações entre FAMES Indicadores de Estresse Microbiano.....	25
Referências.....	26
Anexos	
Anexo 1. Protocolo de extração de ácidos graxos totais baseados no protocolo comercial MIDI (MIDI-FAME).....	30
Anexo 2 - Protocolo de extração de Ácidos Graxos com Ligações Éster (EL-FAME) (adaptado de Schutter e Dick, 2000).....	32
Anexo 3 - Protocolo de análise de Ácidos Graxos Derivados de Fosfolipídios (PLFA).....	34

Análise de Perfis de Ácidos Graxos como Ferramenta para Estudos em Microbiologia do Solo

Marcelo Ferreira Fernandes

Guilherme M. Chaer

Química e origem microbiana de ácidos graxos

A utilização dos perfis de ácidos graxos para a investigação da estrutura das comunidades microbianas é baseada no fato de alguns grupos microbianos serem relativamente enriquecidos em tipos químicos específicos destes compostos, os quais podem ser empregados como biomarcadores destes grupos. Os principais biomarcadores de grupos taxonômicos como fungos, bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e actinomicetos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais ácidos graxos utilizados como biomarcadores para diferentes grupos micorbianos.

Grupo Microbiano	Biomarcadores FAME*	Comentários
Fungos	18:2ω6c	Apresenta boa correlação com o ergosterol, um outro biomarcador de fungos; também abundantes como reserva na fração de lipídios neutros de eucariotos.
Bactérias Gram ⁺	15:0i; 15:0a; 16:0i; 17:0i; 17:0a	
Bactérias Gram ⁻	18:1ω7c; 17:0cy; 19:0cy	
Actinomicetos	10-Me 16:0; 10-Me 17:0; 10-Me 18:0	
Fungos micorrízicos arbusculares	16:1ω5c	Também abundantes em algumas bactérias do grupo <i>Cytophaga</i> / <i>Flexibacter</i> . O uso deste ácido graxo como marcador de FMA é mais apropriado quando este é derivado da fração neutra (lipídios neutros), a qual ocorre exclusivamente em esporos e vesículas destes fungos.
Microeucariotos	20:4ω6c	Muitas vezes utilizado como marcador para protozoários, mas também ocorre em nematóides, fungos e algas.

* Ácidos graxos (FAME) são designados pelo número total de átomos de carbono, acompanhado do número de duplas ligações, com a posição da dupla ligação indicada a partir do metil terminal (ω) da molécula. A configuração da dupla ligação é indicada como *cis* (c) ou *trans* (t). Por exemplo, 16:1ω5c é um FAME com 16 átomos de carbono, contendo uma dupla ligação localizada a cinco carbonos a contar do ω terminal na configuração *cis*. Ácidos graxos ramificados são designados como *iso* (i) ou *anteiso* (a) se a ramificação metil está a um ou dois átomos de carbono, respectivamente, do ω terminal (e.g., 15:0i) ou pela posição do grupo metil a partir do terminal carboxílico da molécula (e.g., 10-Me 16:0). Ácidos graxos ciclopropílicos são designados pelo número total de átomos de carbono acompanhado do prefixo “cy” (e.g., 17:0cy).

Além de biomarcadores taxonômicos, alguns ácidos graxos são típicos de determinados grupos funcionais, o que permite o uso da técnica para monitorar alterações em populações microbianas envolvidas em alguns processos específicos.

Diversos protocolos de extração de ácidos graxos têm sido propostos, os quais diferem na abrangência dos compostos recuperados das amostras de solo. Essas diferenças advêm basicamente do uso ou não de etapas de fracionamento de lipídios totais do solo e das reações empregadas para a liberação de ácidos graxos das células microbianas.

Um ponto em comum entre todos os protocolos é a análise da mistura de ácidos graxos extraídos do solo por cromatografia gasosa. Para permitir o uso desta técnica analítica, esses compostos necessitam ser convertidos em formas mais voláteis, como os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês, fatty acid methyl ester) produzidos por meio de reações de metilação. Além dos ácidos graxos, outros compostos de cadeias hidrofóbicas laterais de interesse taxonômico, tais como cadeias de fitanil e de amino dihidroxialcanos e alquenos, também podem ser metilados por reações específicas. Embora os produtos metilados destes compostos não sejam FAMES, o uso desta denominação será generalizado nesta publicação por questões de simplicidade.

Basicamente, dois mecanismos têm sido mais frequentemente utilizados para converter ácidos graxos de lipídios microbianos em FAMES: a metanólise alcalina branda e a saponificação seguida da metilação dos ácidos graxos (saponificação/metilação). Detalhes sobre os procedimentos para a realização destas duas reações são fornecidos nos Anexos 1 e 2.

A metanólise alcalina branda é uma reação de transesterificação em uma única etapa, catalizada por um álcali na presença de metanol, eficiente principalmente para a formação de FAMES a partir de lipídios com ligações éster (Kates, 1986), os quais são abundantes em eucariotos e bactérias (Figura 1A).

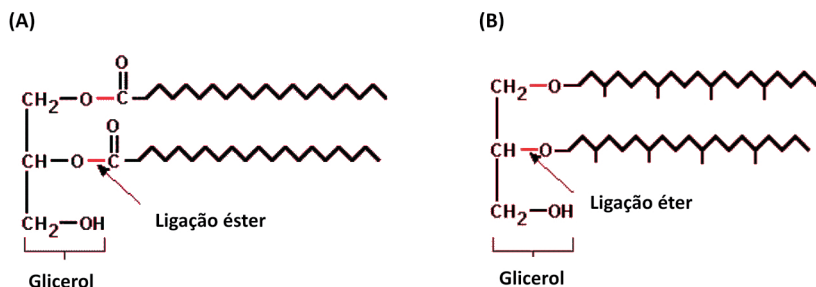


Figura 1. Modelos genéricos de (A) lipídios de membrana plasmática de bactérias e eucariotos, com destaque para a ligação éster, e (B) de arqueas, com destaque para a ligação éter.

Estas ligações éster são encontradas em três classes principais de lipídios: lipídios neutros, glicolipídios e fosfolipídios. Os lipídios neutros constituem importantes fontes de reserva de energia celular em organismos eucariotos, mas também podem ser formados pela hidrólise do fosfato de fosfolipídios após a morte celular. Os glicolipídios são de ocorrência muito variável entre os diferentes grupos microbianos, sendo exemplos das principais fontes destes lipídios a membrana e a parede celular de bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, e membranas fotossintéticas de cianobactérias e algas. Diferentemente dos glicolipídios, os fosfolipídios são constituintes universais e majoritários das membranas celulares, sendo, por isto, a classe de lipídios mais empregada nos estudos de comunidades microbianas. Além disto, em função da rápida ciclagem dos fosfolipídios após a morte celular (KING et al., 1977; WHITE et al., 1979), a composição de ácidos graxos nesta classe de lipídios é considerada um indicador da composição da microbiota viável presente nas amostras de solo.

A reação de saponificação/metilação é eficiente para produzir FAMES e outros compostos metilados de cadeia longa a partir de lipídios celulares com ligações éster, éter e amina, bem como a partir de ácidos graxos e aldeídos livres no solo. Esta reação é feita em duas etapas, ambas sob alta temperatura, que incluem a saponificação, catalizada por uma base (usualmente NaOH), e a metilação, catalizada por ácido na presença de metanol. Após a primeira etapa são formados sais de cadeia longa de metais alcalinos (sabão), os quais, na segunda etapa, são convertidos nas formas voláteis empregadas na análise de cromatografia gasosa. Além dos FAMES, derivados de ácidos graxos, outros compostos voláteis como os dimetil acetais também são produzidos a partir de lipídios com ligações éter por estas reações (KATES, 1986). A recuperação de compostos voláteis derivados de lipídios éter é uma vantagem, já que os mesmos são os principais componentes de membranas de arqueas (Figura 1B). Porém, as condições drásticas de pH e de temperatura empregadas nesta reação têm sido relatadas de alterarem a estrutura química de alguns ácidos graxos e compostos correlatos, especialmente os de cadeias com anel ciclopropil, utilizados como biomarcadores de bactérias gram-negativas, e os de cadeias insaturadas, utilizados como biomarcadores deste mesmo grupo de bactérias e de eucariotos (VULLIET et al., 1974; WROLSTAD et al., 2005).

Outro aspecto diferencial entre os protocolos de extração é a utilização ou não de uma etapa de fracionamento das classes de lipídios do solo previamente

à produção de FAMES. No protocolo de extração mais frequentemente empregado, o dos perfis de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA), os FAMES são produzidos apenas a partir da fração dos fosfolipídios, após a separação prévia desta classe de lipídios das demais por meio de cromatografia de adsorção em coluna de sílica. Em alguns estudos a extração de ácidos graxos a partir da fração neutra também é empregada com objetivos específicos, a serem apresentados adiante. De modo geral, a reação utilizada para a formação de FAMES neste protocolo é a metanólise alcalina branda. Dois protocolos alternativos empregam métodos diretos de extração de ácidos graxos, nos quais as reações para produção dos FAMES são realizadas na própria amostra de solo. Detalhes sobre a abrangência dos compostos extraídos, os métodos e as vantagens e desvantagens de cada um dos três protocolos são descritos na próxima seção.

Métodos de Extração

Três protocolos de extração de ácidos graxos e compostos correlatos têm sido mais empregados para a análise de comunidades microbianas do solo e serão apresentados nesta publicação: 1) análise de perfis de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA, do inglês *phospholipid fatty acid*), 2) de ácidos graxos de lipídios com ligações éster (EL-FA, do inglês *ester-linked fatty acid methyl ester*) e 3) de ácidos graxos totais extraíveis, o qual deriva de um protocolo comercial para identificação de culturas microbianas puras denominado MIDI® (MIDI-FA). As abreviaturas PLFA, EL-FA e MIDI-FA são encontradas sob outras formas sinônimas na literatura, como PL-FAME, EL-FAME e MIDI-FAME, respectivamente. Embora os três métodos difiram quimicamente quanto à capacidade de extração de compostos do solo, observa-se a ocorrência esporádica na literatura da associação errônea entre algumas destas siglas e o método efetivamente empregado.

Ácidos Graxos de Fosfolipídios (PLFA)

Dentre os protocolos baseados na análise de ácidos graxos, o do PLFA é o mais comumente utilizado em estudos de ecologia microbiana. Os materiais e procedimentos para a análise de PLFA são detalhados no Anexo 3.

Este método consiste em três etapas principais: a extração dos lipídios totais do solo, o fracionamento do extrato em classes de lipídios neutros, glicolipídios

e fosfolipídios, e a produção de FAMES a partir da fração fosfolipídios.

Na primeira etapa, os lipídios totais do solo são extraídos sob agitação com uma mistura monofásica de metanol, clorofórmio e tampão fosfato 50 mM, nas proporções de 2:1:0,8 (BLIGH; DYER, 1959). Em seguida, procede-se a partição da mistura de solventes nas fases orgânicas e aquosa e a recuperação desta primeira fase, na qual se encontram os lipídios totais do solo.

Na segunda etapa, o extrato de lipídios totais de solo é fracionado por cromatografia de adsorção em coluna de sílica nas frações neutra, glicolipídica e fosfolipídica, após eluição com clorofórmio, acetona e metanol, respectivamente.

Finalmente, os fosfolipídios são submetidos à reação de formação de FAMES para análise cromatográfica. De modo geral, a reação empregada para esta etapa é a metanólise alcalina branda. Nós conhecemos apenas um trabalho em que os FAMES foram gerados a partir de fosfolipídios pelo uso das reações de saponificação/metilação ácida (MALOSSO et al., 2004). Após a formação dos FAMES, a mistura de reação é dividida em duas fases pela adição de hexano e a fase orgânica aspirada, evaporada sob atmosfera de N₂ ultrapuro, ressuspendida em volume reduzido de hexano e transferida para frascos (GC vials) para a análise por cromatografia gasosa.

A principal vantagem do método de PLFA é a inclusão apenas de ácidos graxos derivados de células viáveis, já que a ciclagem dos fosfolipídios após morte celular é muito rápida (KING et al., 1977; WHITE et al., 1979). Além disto, este fracionamento reduz a possibilidade de extração de ácidos graxos derivados de fontes não-microbianas. Embora o uso de saponificação/metanólise em substituição à metanólise alcalina branda possibilite a inclusão de FAMES derivados de fosfolipídios de arqueas, em adição aos de bactérias e eucariotos, a escolha desta reação deve levar em consideração que as condições drásticas de pH e temperatura podem resultar em danos na estrutura de alguns ácidos graxos de importância taxonômica e comprometer a interpretação destes biomarcadores.

Alguns autores apontam o alto custo e o maior tempo requerido para a extração como as principais desvantagens do método PLFA em relação aos outros protocolos de extração (SCHUTTER; DICK, 2000; STEGER et al., 2003).

Ácidos Graxos de Ligação Éster (EL-FA)

O EL-FA é um método de extração direta de ácidos graxos do solo, descrito por Schutter e Dick (2000). Os materiais empregados e os procedimentos para este protocolo são detalhados no Anexo 2. De modo simplificado, este método consiste na utilização da reação de metanólise alcalina branda diretamente na amostra de solo. Com isso, os FAMES obtidos com este protocolo são derivados de ácidos graxos com ligações do tipo éster em lipídios neutros, glicolipídios e fosfolipídios. Comparativamente ao PLFA, a inclusão de lipídios neutros constitui-se em uma potencial fonte de interferência na análise da microbiota viável, já que estes podem ser derivados de reservas de energia em eucariotos e também de células mortas. Este potencial de interferência deve ser avaliado na escolha do método, já que a proporção entre lipídios neutros e fosfolipídios nas amostras de solo pode variar dependendo dos tratamentos empregados (Figura 5). Em função dos eucariotos utilizarem lipídios neutros como reserva de energia, estas interferências devem ser mais problemáticas para a avaliação de biomarcadores deste grupo microbiano. As células mortas constituem a principal fonte de interferência por lipídios neutros de procariotos, já que estes não armazenam energia sob essa forma. No entanto, as relações entre as quantidades de diversos ácidos graxos biomarcadores de bactérias nas frações neutras são baixas (< 15%) (FERNANDES, 2006). Do mesmo modo, a quantificação de ácidos graxos derivados de glicolipídios (fração acetona no fracionamento em coluna de sílica) de diversos solos mostrou que estes lipídios constituem fontes quantitativamente menos importantes de ácidos graxos (< 12% dos ácidos graxos totais), não representando grande potencial de interferência nos resultados obtidos pelo método do EL-FA, comparativamente ao PLFA.

A análise de EL-FA é bastante rápida e simples, não envolvendo ainda a utilização de altas temperaturas e ácidos e bases concentradas, como no método baseado no procedimento MIDI®, a ser descrito abaixo.

Além disto, comparativamente ao PLFA e ao MIDI-FA, etapas de concentração de extratos de ácidos graxos sob atmosfera de nitrogênio ultrapuro na análise de EL-FAME são minimizadas ou, muitas vezes, dependendo das amostras, tornam-se desnecessárias. Isto resulta em maior rapidez das análises e em economia de custos com a aquisição de nitrogênio ultrapuro. Além da economia com N_2 , o EL-FAME também dispensa o uso de colunas de cromatografia de afinidade com sílica.

Ácidos Graxos Totais Extraíveis pelo Procedimento Comercial MIDI® (MIDI-FA)

Originalmente, esse protocolo foi proposto para a extração total de ácidos graxos e compostos correlatos de culturas puras com a finalidade de identificação taxonômica de isolados microbianos. A identificação é feita pela comparação entre o perfil cromatográfico obtido a partir do isolado em questão e uma biblioteca de perfis de ácidos graxos de microrganismos conhecidos (SASSER, 1990). Os kits de reagentes prontos para uso, o sistema de identificação de picos cromatográficos e as bibliotecas de perfis de ácidos graxos requeridos para a identificação de culturas puras são comercializados pela Microbial Identification Inc. (Newark, Delaware, EUA). Mais tarde, este protocolo foi estendido para a extração de ácidos graxos de amostras de solo com a finalidade de descrever a estrutura da comunidade microbiana destas amostras (CAVIGELLI et al., 1995; BUYER; DRINKWATER, 1997). Para este objetivo, no entanto, o pacote comercializado pela MIDI não é requerido. O MIDI-FA, assim como o EL-FA, é um método de extração direta, porém diferindo deste por utilizar a reação de saponificação/metanolise ácida para gerar os FAMES.

O MIDI-FA consiste de quatro etapas: saponificação, metilação, recuperação dos compostos metilados e uma lavagem da fase orgânica. Na primeira etapa, o solo é tratado com uma solução de NaOH preparada em uma mistura de água e metanol (1:1, vol/vol) e aquecido a 100°C. Durante esta operação as células são lisadas e os ácidos graxos são separados dos lipídios celulares e convertidos em sais de sódio (sabão). A etapa de metilação tem por finalidade aumentar a volatilidade dos compostos formados na saponificação, de modo a torná-los mais adequados à análise cromatográfica. Esta reação ocorre após a adição de uma mistura de ácido forte e metanol ao conteúdo dos frascos, seguida por incubação a 85°C. Para a recuperação dos FAMES produzidos,

hexano é adicionado aos frascos de modo a resultar na partição em duas fases, uma orgânica, contendo os FAMES e outra aquosa-alcoólica, contendo compostos mais polares. A fase orgânica é então aspirada, transferida para novos tubos e tratada com solução alcalina fraca para lavagem de resíduos ácidos. A fase orgânica é novamente aspirada e analisada por cromatografia gasosa.

Pelo fato da reação de saponificação/metanólise ácida incluir mais etapas que a de metanólise alcalina branda, o MIDI-FA é operacionalmente mais complexo que o EL-FAME. Conforme já citado anteriormente, a saponificação/metanólise ácida possibilita a extração de compostos derivados de lipídios de arqueas, em adição aos de bactérias e eucariotos, porém pode danificar a estrutura química de alguns biomarcadores importantes. Além disso, pelo fato desta reação ser capaz de gerar compostos metilados a partir de ácidos graxos livres do solo, ela aumenta a probabilidade de contaminação dos extratos por compostos não-celulares. A elevada co-extração de compostos de origem vegetal, como ceras, cutina e suberina, foi observada em amostras de solo ricos em matéria orgânica submetidas ao método MIDI-FA (Figura 2), (FERNANDES, 2006).

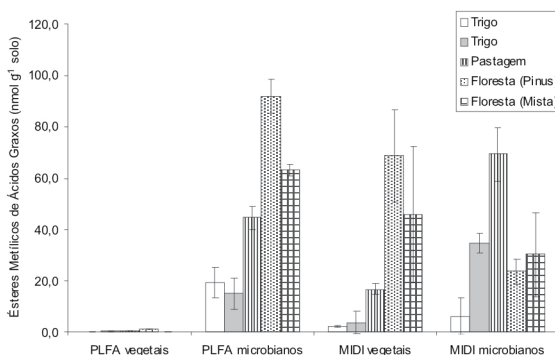


Figura 2. Quantidades de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) de origem vegetal e microbiana extraídos de solos sob diferentes usos pelos procedimentos de PLFA e MIDI. As hastes verticais indicam ± 1 D.P. FAMES microbianos incluem os biomarcadores de fungos e bactérias. Os FAMES vegetais incluem compostos derivados de cutina e suberina detectados nos extratos de solo, como ácidos graxos hidroxilados no carbono terminal, alcoóis de cadeia longa e ácidos dicarboxílicos.

Além disto, a eficiência de extração de ácidos graxos utilizados como biomarcadores microbianos pelo método MIDI-FA decresce com o aumento dos teores de matéria orgânica do solo (FERNANDES, 2006).

Em termos de rapidez do processamento das amostras e custos, o MIDI-FA é intermediário aos métodos de PLFA e EL-FA. Os materiais empregados e os procedimentos para este protocolo são detalhados no Anexo 1.

Usos

Estrutura da comunidade microbiana

As análises de perfis de ácidos graxos têm sido utilizadas para investigar as respostas da estrutura da comunidade microbiana a diversos fatores como uso do solo (WALDROP et al., 2000; CHAER et al., 2009a), sistemas de cultivo (ESPERSCHÜTZ et al., 2007), preparo do solo (CHAER et al., 2009b), adição de resíduos orgânicos (WATTS, 2010), xenobióticos (ZHANG et al., 2010), dentre outros.

Após a obtenção dos perfis de ácidos graxos de amostras sob diferentes condições, inferências a respeito das alterações na estrutura da comunidade são feitas a partir de comparações univariadas das concentrações de biomarcadores de grupos microbianos específicos; de comparações multivariadas, considerando-se a variação em todos os ácidos graxos concomitantemente; ou ainda, de modo simplificado, pela relação entre as somas das massas de biomarcadores de fungos e bactérias (relação fungo/bactérias). Para as duas primeiras estratégias de comparação mencionadas, as massas molares de cada ácido graxo de um cromatograma são, geralmente, relativizadas pela soma das massas de todos os ácidos graxos detectados na amostra. Este tipo de relativização enfatiza as diferenças na composição relativa dos ácidos graxos presentes nas amostras, ao invés de diferenças na quantidade absoluta dos mesmos. Deste modo, comunidades que apresentem biomassas totais distintas, porém com mesma contribuição relativa dos diferentes tipos de ácidos graxos para o total extraído de cada amostra, serão interpretadas como tendo estruturas idênticas.

Quando comparações univariadas são empregadas, as variáveis respostas podem ser constituídas por biomarcadores individuais ou pela soma de biomarcadores de um determinado grupo microbiano. Assim, como exemplo, variações na proporção de bactérias gram-positivas nas comunidades

microbianas de diferentes tratamentos podem ser comparadas pelas análises univariadas dos biomarcadores 15:0i, 15:0a, 16:0i, 17:0a, ou pela soma destes cinco biomarcadores (Figura 3).

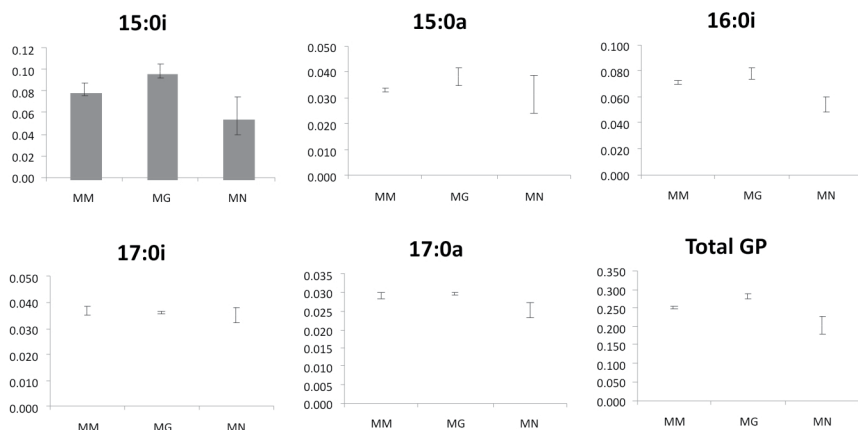


Figura 3. Frações molares de biomarcadores individuais (15:0i; 15:0a; 16:0i; 17:0i e 17:0a) e totais (Total GP) de bactérias gram-positivas relativas ao conteúdo dos ácidos graxos microbianos extraídos de amostras de um Argissolo Amarelo dos tabuleiros costeiros de Sergipe sob diferentes usos do solo (MM = milho em monocultura; MG = cultivo de milho em alamedas de gliricídia; MN = mata nativa).

No caso de comparações de biomarcadores individuais, diferenças entre tratamentos quanto à participação de um determinado grupo microbiano são inferidas a partir de mudanças conjuntas significativas em todos ou na maioria dos biomarcadores desse grupo.

Quando a estrutura das comunidades é descrita pela relação fungos/bactérias, a soma das massas molares dos marcadores fúngicos (18:1 ω 2c e 18:1 ω 9c) é dividida pela soma das massas molares dos biomarcadores de bactérias (15:0i, 15:0a, 16:0i, 17:0i, 17:0a, 18:1 ω 7c, 17:0cy e 19:0cy), sendo as razões obtidas avaliadas como variáveis respostas univariadas (Figura 4).

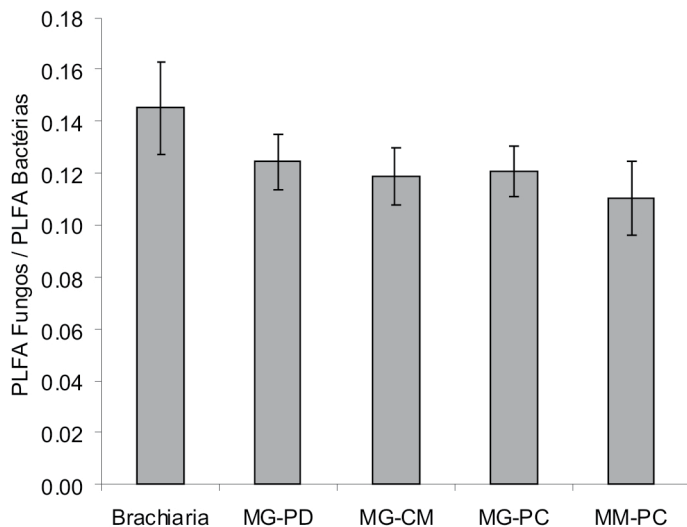


Figura 4. Relação entre as massas de ácidos graxos biomarcadores de fungos e de bactérias em áreas de um Argissolo Amarelo mantidas há oito anos sob pousio com dominância de *Brachiaria*, cultivadas com consórcio milho e guandu sob sistema de plantio direto (MG-PD), cultivo mínimo (MG-CM), preparo convencional (MG-PC) e com monocultivo de milho sob preparo convencional (MM-PC). As hastes verticais indicam \pm 1D.P.

Variações nos biomarcadores utilizados para o cálculo desta relação variam entre autores, sendo que as principais variações incluem a utilização apenas do 18:2 ω 6c como marcador de fungos e a adição de ácidos graxos de actinomicetos (16:0 10-Me, 17:0 10-Me e 18:0 10-Me) como biomarcadores de bactérias.

Quando a abordagem multivariada é empregada, as estratégias de análises, geralmente, incluem: a representação gráfica da similaridade entre as estruturas das comunidades microbianas sob diferentes condições por meio de técnicas de ordenação (ex. non-metric multidimensional scaling, NMS), (KRUSKAL, 1964); a descrição dos biomarcadores associados às variações na estrutura das comunidades, utilizando-se correlações entre as concentrações dos biomarcadores e os eixos das ordenações; e testes de hipótese de não-diferença multivariada entre os tratamentos (ex. multiresponse permutation

procedures, MRPP), (BIONDINI et al., 1985). Análises de correlação entre a estrutura da comunidade microbiana e variáveis univariadas descritoras do ambiente físico (pH, temperatura, umidade do solo, concentrações de nutrientes individuais, etc), da produtividade agrícola (produção de grãos, frutos, parte aérea, raízes ou fitomassa total), de processos e variáveis de solo de naturezas microbianas, físicas e químicas (taxa de emissão de N_2O , taxa de lixiviação de nitrato, agregados estáveis, densidade do solo), dentre outros, podem ser feitas por técnicas estatísticas como os modelos de regressão em árvore (BREIMAN et al., 1984) ou pelo teste de Mantel (DOUGLAS; ENDLER, 1982). Correlações entre a estrutura da comunidade microbiana e outras variáveis multivariadas (composição da flora, por exemplo) também podem ser feitas por estas duas técnicas.

Uma preocupação comum entre usuários da técnica de ácidos graxos para o levantamento das estruturas das comunidades microbianas refere-se à adequação do uso dos ácidos graxos 18:1 ω 9c e 18:2 ω 6c como biomarcadores de fungos, já que os mesmos também ocorrem em grandes quantidades em plantas. A utilização destes compostos como biomarcadores de fungos tem sido considerada adequada em função da alta correlação apresentada entre as concentrações destes ácidos graxos na fração fosfolipídica e as concentrações de ergosterol, um marcador exclusivo de fungos, em uma série de solos com diferentes teores de matéria orgânica e pH (FROSTEGÅRD; BÅÅTH, 1996). Mais recentemente, Kaiser et al. (2010) demonstraram que a contribuição de fontes vegetais destes marcadores nos extratos de solo obtidos pela técnica de PLFA são mínimas. No entanto, pelo fato destes resultados terem sido obtidos com a técnica do PLFA, a adequabilidade do uso de ácidos graxos como marcadores de fungos não é, necessariamente, válida para os protocolos alternativos.

Os três protocolos apresentados têm sido apresentados como capazes de diferenciar amostras de solo sob tratamentos distintos quanto à composição dos ácidos graxos (DRENOVSKY et al., 2004; SCHUTTER; DICK, 2000). No entanto, deve-se atentar para a possibilidade de que essa diferenciação pode estar relacionada a fatores alheios às variações na estrutura da comunidade microbiana. Dentre estes fatores, a extração de ácidos graxos não-microbianos, a modificação da estrutura química de biomarcadores importantes e a ocorrência de variações na eficiência de extração em função dos teores de matéria orgânica das amostras de solo merecem atenção especial (FERNANDES, 2006). O protocolo MIDI-FA é muito eficiente na

extração de diversos compostos de cadeia longa de origem vegetal, como os constituintes de ceras, suberina e cutina, especialmente em solos sob florestas e com altos teores de matéria orgânica (Figura 2). Além disto, as reações de saponificação/metanólise ácida utilizadas neste protocolo possuem alto potencial de alterar a estrutura de biomarcadores poliinsaturados e cíclicos de importância taxonômica. Finalmente, decréscimos na eficiência de extração de biomarcadores microbianos por este protocolo em função do aumento dos teores de matéria orgânica do solo têm sido reportados (FERNANDES, 2006).

Os problemas relacionados acima para o MIDI-FA são menos intensos ou inexistentes no protocolo de extração por EL-FAME. Deste modo, diferenças na interpretação das estruturas das comunidades microbianas de amostras de solo extraídas por EL-FA e PLFA devem ser menos relevantes que as observadas entre MIDI-FA e PLFA. O uso comum da reação de metanólise alcalina branda para a geração de FAMES nos protocolos de EL-FA e de PLFA é um fator importante para reduzir as interferências relacionadas às alterações das estruturas químicas de biomarcadores microbianos. As condições mais brandas de temperatura e pH utilizadas no EL-FA também contribuem para reduzir a co-extração de substâncias interferentes derivadas de resíduos vegetais, comparativamente ao MIDI-FA. Embora a extração destes compostos seja verificada em extratos de EL-FA, a capacidade dos mesmos interferirem expressivamente na determinação da estrutura das comunidades microbianas é relativamente pequena, já que, proporcionalmente aos marcadores microbianos, as quantidades extraídas destes compostos é muito reduzida. De fato, os ácidos graxos derivados de reservas microbianas constituem-se a principal fonte potencial de interferência na determinação das comunidades microbianas de amostras de solo pela técnica do EL-FA. Essa interferência é maior na quantificação dos componentes eucariotos das comunidades (Figura 5), á que os procariotos não utilizam os ácidos graxos como fontes de reserva de energia. Interações significativas entre o método de extração (PLFA e EL-FA) e o tipo de cobertura vegetal foram verificadas para as quantidades de marcadores de fungos recuperadas de amostras de solo, o mesmo não sendo válido para os marcadores de procariotos (FERNANDES, 2006).

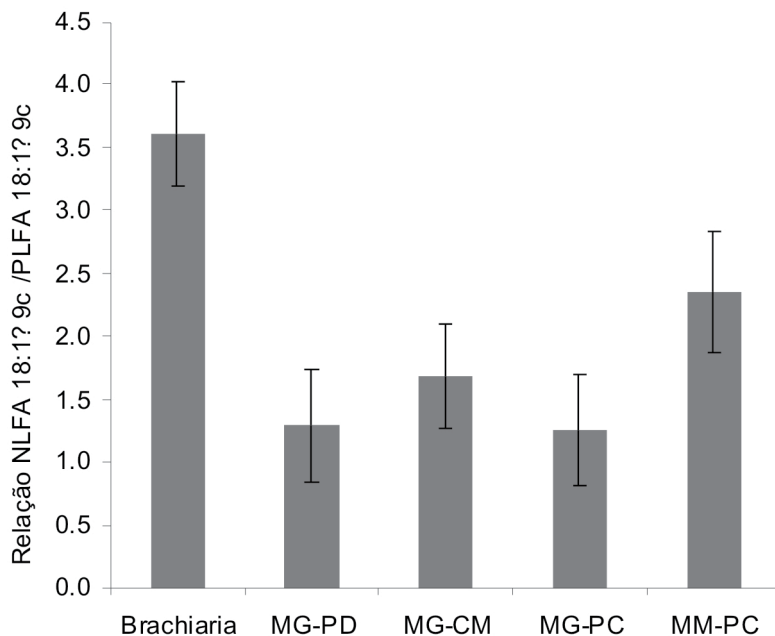


Figura 5. Relação molar de um ácido graxo biomarcador de fungos (18:1 ω 9c) nas frações de lipídios neutros e fosfolípidios, extraídas de um Argissolo amarelo dos tabuleiros costeiros de Sergipe sob diferentes usos da terra [pousio natural com *Brachiaria*; cultivo consorciado de milho e guandu sob plantio direto (MG-PD), cultivo mínimo (MG-CM), e preparo convencional (MG-PC); e monocultura de milho sob preparo convencional (MM-PC)].

Estes resultados indicam que as diferenças proporcionais nos biomarcadores de procariotos entre amostras de solo devem ser constantes entre o EL-FA e o PLFA. Deste modo, espera-se que a interpretação das variações na estrutura das comunidades microbianas seja equivalente entre os dois métodos, caso apenas os ácidos graxos marcadores de procariotos sejam incluídos nas análises dos dados.

Índice de Diversidade Microbiana

O uso das técnicas de ácidos graxos para cálculos de índices de diversidade deve ser visto com cautela. O número de tipos distintos de ácidos graxos detectados nas análises cromatográficas tem sido utilizado para expressar a riqueza taxonômica da amostra, de modo análogo ao índice de riqueza de espécies (número de espécies). Um primeiro ponto a ser ressaltado nesta avaliação é o de que muitas espécies contêm vários tipos distintos de ácidos graxos, de modo que não há, necessariamente, uma relação direta entre o número de ácidos graxos e o número de espécies na amostra. Assim, uma riqueza elevada de ácidos graxos pode ser encontrada mesmo em amostras com um número reduzido de espécies, desde que cada uma destas espécies possua uma alta diversidade de ácidos graxos em sua composição celular. Além disto, diferenças na riqueza de ácidos graxos entre amostras podem surgir ou serem superestimadas em razão da utilização de valores absolutos fixos para o limite mínimo de área determinado para integração dos picos em cromatogramas de amostras distintas. Assim, amostras com maior biomassa tenderão a apresentar maior riqueza que amostras com menor biomassa, pelo fato de mais compostos atingirem o limite mínimo de área selecionado para integração dos picos cromatográficos. Este mesmo problema também representa uma fonte potencial de interferência na análise da estrutura da comunidade microbiana descrita acima. Como alternativa para minimizar esta tendência dependente da biomassa, sugere-se a utilização de valores absolutos variáveis entre amostras para a integração dos picos. Estes valores mínimos podem ser estabelecidos para cada amostra, em relação à área do pico do ácido graxo 16:0, o qual está presente em todos os organismos. De acordo com nossa experiência, valores mínimos de integração equivalentes a 3% da área do 16:0 resultam em número elevado de picos (cerca de 25) comuns em quase todas as amostras, independentemente da biomassa microbiana. É importante ressaltar que o uso de protocolos de extração direta, especialmente o MIDI-FA, podem contribuir para superestimar o índice de riqueza das amostras em função da ocorrência de contaminantes derivados de fontes não-celulares.

Outra questão que demanda cuidado é a utilização de ácidos graxos no cálculo do índice de equitabilidade ("eveness"). Amostras com elevada equitabilidade possuem um alto número de espécies com números (ou massas) similares de indivíduos pertencentes a cada uma delas. Usualmente, quando os perfis de ácidos graxos são utilizados para a determinação deste índice, pressupõe-se

que uma amostra possua alta equitabilidade quando a distribuição das massas totais de ácidos graxos extraídos da mesma seja aproximadamente equitativa entre os diferentes tipos de ácidos graxos detectados. Pelo fato dos organismos apresentarem proporções distintas dos diversos tipos de ácidos graxos em sua composição celular, não há, necessariamente, uma correspondência direta entre a equitabilidade das massas dos ácidos graxos e a equitabilidade do número ou da massa de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos microbianos. Uma amostra com distribuição aproximadamente equitativa do número (ou massa) de indivíduos entre suas espécies componentes pode apresentar baixa equitabilidade de ácidos graxos, desde que um ou mais destes ácidos sejam proporcionalmente dominantes na composição celular destes organismos.

Biomassa Microbiana

A análise de ácidos graxos pode ser utilizada para determinação da biomassa microbiana, desde que a recuperação dos ácidos graxos seja quantitativa nas diferentes etapas do protocolo. Adições de quantidades conhecidas de padrões internos de ácidos graxos pouco comuns em microrganismos (ex. 19:0) têm sido utilizadas para quantificar a porcentagem de recuperação de ácidos graxos de diferentes etapas e, deste modo, estimar a quantidade total destes ácidos nas amostras. No protocolo de PLFA, estas adições são feitas geralmente antes da reação de metilação, na forma de 19:0, ou após esta reação, na forma de éster metílico de 19:0. No entanto, estas adições não asseguram a recuperação quantitativa dos compostos nas fases anteriores de extração.

Para aumentar a recuperação quantitativa em todas as fases, passos consecutivos de adição e retirada de volumes múltiplos de solventes orgânicos podem ser realizados nas etapas de transferência de frações e nas partições de fase de todo o processo do protocolo de PLFA. Normalmente, após a partição de fases de misturas de solventes, a fase orgânica não pode ser totalmente aspirada sob o risco de contaminação desta com a fase aquosa. Deste modo, sugere-se que após a remoção de cerca de 70-80% do volume da fase orgânica, passos de adição e remoção sucessivos de volumes equivalentes do solvente orgânico sejam repetidos três vezes. Este procedimento deve ser utilizado nas partições com clorofórmio na fase de extração dos lipídios totais do solo, na transferência do extrato concentrado para as colunas cromatográficas de afinidade, na partição com hexano para a recuperação de FAMES após metanólise e na transferência dos FAMES para os frascos de cromatografia (GC vials) após a concentração sob N_2 ultrapuro. Com a

utilização deste procedimento foram encontradas correlações elevadas entre a soma dos ácidos graxos extraídos pelo protocolo de PLFA e a biomassa estimada de acordo com o método de fumigação-incubação em uma série de 29 amostras de solos com teores de matéria orgânica e texturas variadas (Figura 6); (FERNANDES, 2006).

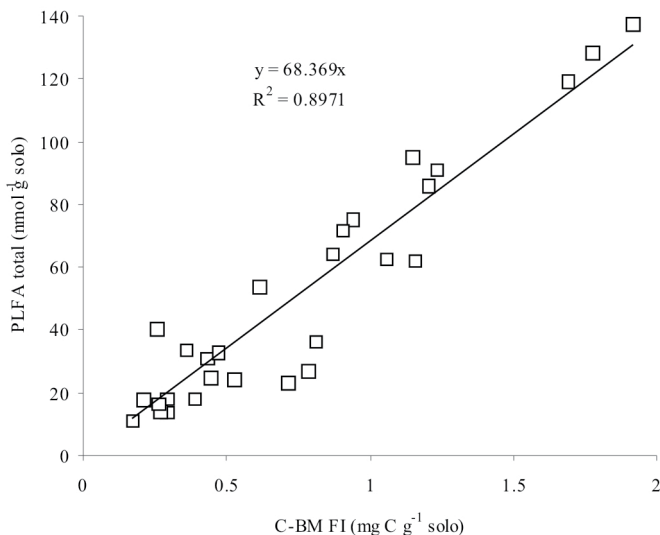


Figura 6. Correlação entre o total de PLFA e o carbono da biomassa microbiana quantificado pelo método da fumigação-incubação ($k_c = 0,41$) de amostras de solo com variações do conteúdo de carbono orgânico (9 a 42 g kg⁻¹), textura (areia franca a franco argilosa) e pH (5,4 a 7,1).

Correlações entre a soma de ácidos graxos extraídos pelos métodos de extração direta (EL-FA e MIDI-FA) e a biomassa quantificada por métodos tradicionais baseados na fumigação das amostras não foram determinadas, porém espera-se que contaminantes não-celulares, especialmente no método MIDI-FA possam interferir nesta correlação. Quantidades elevadas de ácidos graxos com hidroxilas terminais (12:0 ω OH, 14:0 ω OH, 16:0 ω OH), álcoois (16:0 álcool) e ácidos dicarboxílicos (16:0 dicarboxílico), típicos de ceras, suberinas e cutinas de plantas, foram detectados em extratos de amostras de solo

com altos teores de matéria orgânica obtidos pelo método MIDI-FA (Figura 2), (FERNANDES 2006). Além disto, conforme já comentado anteriormente, a eficiência de extração de ácidos graxos de amostras de solo pelo método MIDI-FA varia em função dos teores de matéria orgânica do solo, o que impossibilita a comparação dos valores absolutos de biomassa obtidos entre amostras distintas quanto a esta variável.

Relações entre FAMES Indicadores de Estresse Microbiano

As relações entre alguns ácidos graxos extraídos da fração fosfolipídica são alteradas sob condições de estresse. Desse modo, diferenças nessas relações em amostras obtidas de ambientes distintos indicam alterações fisiológicas na comunidade microbiana em resposta a algum fator de estresse do meio. Por exemplo, o aumento da relação entre isômeros trans e cis de FAMES monoinsaturados podem indicar que a comunidade microbiana encontra-se sob privação de nutrientes ou sob algum outro tipo de estresse ambiental (GUICKERT et al., 1986; KIEFT et al., 1994; PIETIKÄINEN et al., 2000). Condições de estresse também levam ao aumento da proporção de ácidos graxos ciclopropílicos para os seus precursores monoenólicos (Figura 7).

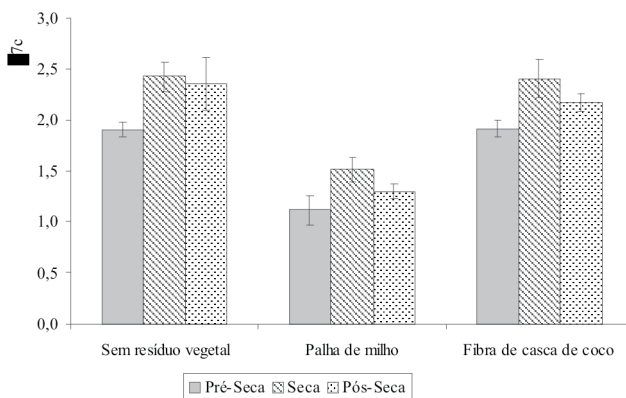


Figura 7. Indicador de estresse microbiano descrito pela relação entre os PLFAs 19:0cy e 18:1w7c, extraídos de amostras de um Argissolo amarelo submetido à adição de resíduos vegetais com diferentes composições químicas e a variações temporais na umidade do solo. Os tratamentos de resíduos incluem o controle (sem adição de resíduos vegetais), a adição de palha de milho (lignina 3%) e de fibra de casca de coco (lignina 45%). Os resíduos foram adicionados na proporção de 4 mg C g⁻¹ solo. A fase pré-seca correspondeu ao período de incubação de zero a 160 dias, sob potencial de água no solo de -0,12 MPa. A fase de seca correspondeu ao período de incubação de 160 a 290 dias, a -1,5 MPa. Após este período o solo foi reumedecido e mantido a -0,12 MPa. As amostragens foram feitas aos 112, 212 e 350 dias após início da incubação.

Por exemplo, a relação entre o PLFA 19:0cy e o seu precursor 18:1 ω 7c têm sido proposta com um indicador do status fisiológico de comunidades de bactérias Gram-negativas (BOSSIO; SCOW, 1998; BOSSIO et al., 1998). Nessas bactérias, os precursores são crescentemente convertidos para ácidos graxos ciclopropílicos à medida que as bactérias transitam de um estado de crescimento para um estado de ausência de crescimento.

Referências

BIONDINI, M. E.; BONHAM, C. D. et al. Secondary successional patterns in a sagebrush (*Artemisia tridentata*) community as they relate to soil disturbance and soil biological activity. **Vegetatio**, Australia, v. 60, p. 25-36, 1985.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOSSIO, D. A.; SCOW, K. M. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, n. 3, may./jun. p. 265-278, 1998.

BOSSIO, D. A.; SCOW, K. M., et al. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, n. 1, jul./aug. p. 1-12, 1998.

BREIMAN, L.; FRIEDMAN, J. H. et al. **Classification and regression trees**. Belmont, CA, USA: Chapman & Hall/CRC. 1984. 368 p. (The Wadsworth statistics/probability series).

BUYER, J. S.; DRINKWATER, L. E. Comparison of substrate utilisation assay and fatty acid analysis of soil microbial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, p. 3-11, 1997.

CAVIGELLI, M. A.; ROBERTSON, G. P. et al. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. **Plant and Soil**, Holanda, v. 170, p. 99-113, 1995.

CHAER, G. M.; FERNANDES, M. F. et al. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 414-424, 2009a.

CHAER, G. M.; FERNANDES, M. F. et al. Shifts in microbial community composition and physiological profiles across a gradient of induced soil degradation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 73, n. 4, p. 1327-1334, 2009b.

DOUGLAS, M. E.; ENDLER, J. A. Quantitative matrix comparisons in ecological and evolutionary investigations. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 99, p. 777-795, 1982.

DRENOVSKY, R. E.; ELLIOTT, G. N. et al. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 11, nov, p. 1793-1800, 2004.

ESBERSCHÜTZ, J.; GATTINGER, A. et al. Response of soil microbial biomass and microbial structures under conventional and organic farming systems under identical crop rotations. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 26-37, 2007.

FERNANDES, M. F. **Fatty acid profiling of soil microbial communities: A comparison of extraction methods and temporal dynamics in plant residue amended soils**. (Dissertation). Crop and Soil Science, Oregon State University, Corvallis, 2006. 154 p.

FROSTEGÅRD, Å.; BÅÅTH, E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, n. 1-2, apr. p. 59-65, 1996.

GUCKERT, J. B.; HOOD, M. A. et al. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 794-801, 1986.

KAISER, C.; FRANK, A. et al. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 ω 6,9 and 18:1 ω 9. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 42, p. 1650-1652, 2010.

KIEFT, T. L.; RINGELBERG, D. B. et al. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 3292-3299, 1994.

KING, J. D.; WHITE, D. C. et al. Use of lipid composition and metabolism to examine structure and activity of estuarine detrital microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, p. 1177-1183, 1977.

KRUSKAL, J. B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, p. 115-129, 1964.

MALOSSO, E.; ENGLISH, L. et al. Use of C-13-labelled plant materials and ergosterol, PLFA and NLFA analyses to investigate organic matter decomposition in Antarctic soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 1, p. 165-175, 2004.

PIETIKÄINEN, J.; HIUKKA, R. et al. Does short-term heating of forest humus change its properties as a substrate for microbes? **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 32, p. 277-288, 2000.

RAJENDRAN, N.; MATSUDA, O. et al. Determination of microbial biomass and its community structure from the distribution of phospholipid ester-linked fatty acids in sediments of Hiroshima Bay and its adjacent bays. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, London, v. 34, p. 501-514, 1992.

RAJENDRAN, N.; SUWA, Y. et al. Microbial community structure in sediments of a polluted bay as determined by phospholipid ester-linked fatty acids. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 24, p. 305-309, 1992.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids.** **Tech. Note #101.** Newark, DE: Microbial ID, 1990

SCHUTTER, M. E.; DICK, R. P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 1659-1668, 2000.

STEGER, K.; JARVIS, Å. et al. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 55, p. 371-382, 2003.

VULLIET, P.; MARKEY, S. P. et al. Identification of methoxyesters artifacts produced by methanolic-HCl solvolysis of the cyclopropane fatty acids of the genus *Yersinia*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam. v. 348, p. 299-301, 1974.

WALDROP, M. P.; BALSER, T. C. et al. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 32, n. 13, nov, p. 1837-1846, 2000.

WATTS, D. B. Soil microbial community dynamics as influenced by composter dairy manure, soil properties, and landscape position. **Soil Science**, Madison, v. 175, p. 474-486, 2010.

WHITE, D. C.; DAVIS, W. M. et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia*, Berlin, v. 40, p. 51-62, 1979.

WHITE, D. C.; RINGELBERG, D. B.. Signature lipid biomarker analysis. In: R. S. Burlage, R. Atlas, et al (Ed.). **Techniques in microbial ecology**. New York: Oxford University Press, 1998. v. 255-272. (Signature lipid biomarker analysis).

WROLSTAD, R. E.; DECKER, E. A. et al. **Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. 606 p.

ZHANG, C.; XU, J. et al. Impact of imazethapyr on the microbial community structure in agricultural soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 81, p. 800-806, 2010.

Anexo 1

Protocolo de extração de ácidos graxos totais baseado no protocolo comercial MIDI (MIDI-FAME)

Vidrarias

- Tubos de centrífuga (35 ml), com tampas de rosca com revestimento de re teflon.
- Tubos de vidro (13 x 100), com tampas de rosca com revestimento de teflon.
- Frascos para cromatografia gasosa (GC vials), com capacidade de 2 ml, com tampa de pressão ou de rosca.

Equipamentos

- Balança semi-analítica.
- Agitador de tubos tipo vortex.
- Banho-maria (até 100°C).
- Centrífuga com rotor compatível com tubos (20x125 mm) e velocidade de 480 *xg*.
- Mesa agitadora orbital.
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC-FID) e coluna cromatográfica capilar (5% bifenil-95% dimetilpolisiloxano, 25 m).

Reagentes

- Hidróxido de sódio (NaOH).
- Metanol.
- Ácido clorídrico.
- Hexano.

Procedimento

- Adicionar 3 g de solo na umidade de campo em um tubo de vidro de centrífuga (35 ml).
- Adicionar ao solo 3 ml de uma solução de NaOH (3,75 *M*) preparada em água:metanol (1:1, v/v) e fechar os tubos com tampa revestida de teflon.
- Homogeneizar conteúdo dos tubos em um agitador tipo vortex por 15 s.
- Colocar tubos em banho-maria a 100°C por 30 min.

- Após retirar os tubos do banho-maria, adicionar 6 ml de uma mistura de ácido clorídrico 6,0 M e metanol, na proporção de 1:0,85.
- Após fechar os tubos, homogeneizar conteúdo em vortex, por 15 s.
- Incubar tubos em banho-maria a 85°C, por 10 min.
- Adicionar 3 ml de hexano ao tubos para promover a partição das fases orgânica e aquosa.
- Agitar tubos em vortex por 15 s.
- Centrifugar tubos por 10 min (480 x g).
- Aspirar fase orgânica (superior) com uma pipeta e transferir para tubos de vidro (13 x 100 mm) com tampas de rosca revestidas com teflon.
- Adicionar 3 ml de solução alcalina (0,3 M de NaOH) e misturar conteúdo em mesa agitadora orbital, com baixa velocidade (50-80 rpm), por 5 min.
- Transferir fase orgânica para frascos de cromatografia (GC vials) de 2 ml.
- Injetar amostras em cromatógrafo a gás equipado com coluna capilar (5% bifenil-95% dimetilpolisiloxano, 25 a 30 m) e detector de ionização de chama (FID). O equipamento deve ser programado para promover um incremento de 50°C por min, desde 120 a 270°C. As temperaturas do injetor e do detector são de 250°C e 280°C, respectivamente.
- Proceder à identificação dos picos cromatográficos com base nas comparações dos tempos de retenção de FAMES microbianos das amostras e de padrões comerciais (ex. BAME e FAME 37, Supelco).

Anexo 2

Protocolo de extração de Ácidos Graxos com Ligações Éster (EL-FAME) (adaptado de Schutter e Dick, 2000)

Vidrarias

- Tubos de centrífuga (35 ml), com tampas de rosca com revestimento de teflon.
Frascos para cromatografia gasosa (GC vials), com capacidade de 2 ml, com tampa de pressão ou de rosca.
- Redutores de volume (inserts) com capacidade de 200 μ L para frascos de cromatografia gasosa (GC vials).
- Tubos de ensaio.

Equipamentos

- Balança semi-analítica.
- Agitador de tubos tipo vortex.
- Banho-maria (37°C).
- Evaporador de solventes para tubos, com conexão a tanque de N₂ ultrapuro e controle de temperatura (37-40°C).
- Centrífuga com rotor compatível com tubos (20x125 mm) e velocidade de 480 x g.
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC-FID) e coluna cromatográfica capilar (5% bifenil-95% dimetilpolisiloxano, 25 m).

Reagentes

- Hidróxido de sódio (NaOH).
- Metanol.
- Hexano.
- Tolueno.

Procedimento

- Adicionar 3 g de solo na umidade de campo em um tubo de vidro de centrífuga (35 ml).
- Adicionar ao solo 15 ml de uma solução de KOH (0,2 M) preparada em

metanol e fechar os tubos com tampa revestida de teflon.

- Homogeneizar conteúdo dos tubos em um agitador tipo vortex por 15 s.
- Colocar tubos em banho-maria a 37°C por 60 min. Homogeneizar o conteúdo dos frascos a cada 10 min. utilizando um agitador do tipo vortex.
- Adicionar 3 ml de ácido acético 1 M e homogeneizar tubos em vortex.
- Adicionar 10 ml de hexano aos tubos para promover a partição das fases orgânica e aquosa e homogeneizar em vortex.
- Centrifugar tubos por 10 min (480 x g).
- Transferir fase orgânica com hexano (superior) com uma pipeta e transferir para tubos de ensaio.
- Secar o hexano contendo os FAMES a 37-40°C sob N₂ ultrapuro.
- Ressuspender FAMES em hexano e transferir para um tubo de cromatografia âmbar (GC vials). Em geral, a utilização de redutores de volume (inserts) não é necessária.
- Injetar 1 µL das amostras em cromatógrafo a gás equipado com coluna capilar (5% bifenil-95% dimetilpolisiloxano, 25 m) e detector de ionização de chama (FID). O equipamento deve ser programado para promover um incremento de 5°C por min, desde 120 a 270°C. As temperaturas do injetor e do detector são de 250°C e 280°C, respectivamente.
- Proceder à identificação dos picos cromatográficos com base nas comparações dos tempos de retenção de FAMES microbianos das amostras e de padrões comerciais (ex. BAME e FAME 37, Supelco).

Comentários dos autores

- Utilizar luvas descartáveis de nitrila durante todo o procedimento.
- As adições de solventes orgânicos, ácidos e bases, assim como a transferência da fase orgânica entre tubos, devem ser feita em capela de exaustão.
- Embora o uso de pipetas de Pasteur para adição de solventes orgânicos e a aspiração e transferência da fase orgânica entre tubos tenha sido recomendado por diversos autores, o uso de micropipetas com ponteiras de alta qualidade não resulta em contaminação das amostras.

Anexo 3

Protocolo de análise de Ácidos Graxos Derivados de Fosfolipídios (PLFA)

Vidrarias

- Tubos de centrífuga (35 ml), com tampas de rosca com revestimento de teflon.
- Frascos para cromatografia gasosa (GC vials), com capacidade de 2 ml, com tampa de pressão ou de rosca.
- Redutores de volume (inserts) com capacidade de 200 μ L para frascos de cromatografia gasosa (GC vials).
- Tubos de ensaio.
- Funis de vidro.
- Erlenmeyers 50 ml.

Equipamentos

- Balança semi-analítica.
- Agitador de tubos tipo vortex.
- Banho-maria (37°C).
- Cuba a vácuo (manifold) para acoplamento e eluição de colunas de sílica;
- Evaporador de solventes para tubos, com conexão a tanque de N₂ ultrapuro e controle de temperatura (37-40°C).
- Centrífuga com rotor compatível com tubos (20x125 mm) e velocidade de 480 x g.
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC-FID) e coluna cromatográfica capilar (5% bifenil-95% dimetilpolisiloxano, 25 a 30 m).
- Mesa agitadora.

Etapas

Extração dos lipídios totais do solo

Solventes e soluções

- Clorofórmio, metanol, tampão fosfato 50 mM (relação 1:2:0,8).
- Água deionizada e solução de NaCl 2 M.

Procedimento

- Pesar 3 g de solo em um tubo de centrífuga de 35 ml. Também faça um branco sem solo.
- Adicione água deionizada suficiente para trazer a umidade do solo para 50% e adicione a mesma quantidade de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) para fazer um tampão 50 mM. Adicione clorofórmio e metanol de acordo com a relação acima.

Exemplo: 3 g de solo seco com conteúdo gravimétrico de água de 0,432 corresponde a 4,30 g de solo úmido (1,30 g ou ml de H₂O presente). Nesse caso, precisa-se de 1,5 ml de H₂O total. Adicione 0,2 ml H₂O + 1,5 ml de tampão fosfato 0,1 M.

Adicione 7,5 ml de metanol e 3,75 ml de clorofórmio.

Agite por 2 h e deixe em repouso por 24 h.
- Centrifugue os tubos por 12 min a 2000 rpm e despeje o sobrenadante em um filtro Whatman #1 previamente dispostos em funis de vidro apropriados. Colete o filtrado em Erlenmeyer de 50 ml).
- Adicione as mesmas quantidades de clorofórmio e metanol aos tubos e centrifugue novamente por 5 a 6 minutos. Repita esse procedimento mais 2 vezes.
- Adicione solução de NaCl 2 M ao filtrado para separar as fases. O volume da solução de NaCl deve ser igual ao volume total de clorofórmio adicionado nos passos 2 e 4.
- Transfira a fase do clorofórmio (fase do fundo) para tubos de ensaio novos e seque sob N₂ ultrapuro (99,9%).
- Se necessário, nesta fase, os extratos secos podem ser congelados (-20°C) sob N₂ ultrapuro até continuação do procedimento.

Separação de lipídios

Consumíveis e solventes

- Colunas de cromatografia de adsorção com sílica de 3 ml (Supelco cat. # 505048 Supelclean LC-Si SPE tubes, ou equivalente)

Clorofórmio, acetona, metanol

Procedimento

- Adicione 2 ml de clorofórmio em cada coluna.
- Adicione os lipídios secos às colunas -> dissolva em alíquotas de 0,5 ml de clorofórmio e transfira para a coluna. Repita esse passo mais 2 vezes.
- Adicione três vezes 2 ml de clorofórmio para separar os lipídios neutros.
- Adicione três vezes 2 ml de acetona para separar os glicolipídios. Os volumes acumulados de clorofórmio e acetona utilizados na eluição das colunas podem ser descartados.
- Troque os tubos de ensaio para a coleta dos fosfolipídios (ex. tubos pyrex de 10 ml).
- Adicione três vezes 2 ml de metanol para separar os fosfolipídios (**não descartar**).
- Imediatamente seque o metanol contendo os fosfolipídios sob N_2 .
- Se necessário, nesta fase, os extratos secos podem ser congelados ($-20^\circ C$) sob N_2 ultrapuro até continuação do procedimento. É importante, no entanto, que o metanol seja totalmente evaporado.

Metilação alcalina branda

Solventes e Soluções

- KOH 0,2 M (1.12 g KOH dissolvido em 100 ml metanol).
- Metanol e tolueno.
- Ácido acético 1 M (5.72 ml de ácido acético em 100 ml H_2O).
- Água deionizada.
- Hexano.

Procedimento

- Dissolver os fosfolipídios secos pela adição de 1 ml de 1:1 metanol:tolueno, agitar os tubos e adicionar 1 ml de KOH 0,2 M.
- Aquecer em banho-maria a $38-42^\circ C$ por 15 min.
- Adicionar 2 ml de água deionizada, 0,3 ml de ácido acético 1 M e 0,5 ml de hexano.
- Homogenize o conteúdo dos frascos em vortex e deixe em repouso para separação das fases. Antes de proceder o próximo passo, as fases devem estar transparentes.
- Remova o hexano e transfira para novos tubos.
- Adicione e remova o hexano mais duas vezes.

- Seque o extrato de hexano sob N_2 (leva menos de uma hora para secar).
- Redissolva os ésteres metílicos em 80 μ L de hexano e transfira para inserts de 200 μ L dispostos dentro de frascos âmbar de cromatografia de 2 ml. Repita mais uma vez a lavagem com o hexano.
- Complete o volume total dos inserts com hexano e feche o frasco GC com tampa de teflon apropriada.
- Injetar 1 μ L das amostras em cromatógrafo a gás equipado com coluna capilar (5% bifenil-95% dimetilpolisiloxano, 25 m) e detector de ionização de chama (FID). O equipamento deve ser programado para promover um incremento de 5°C por min, desde 120 a 270°C. As temperaturas do injetor e do detector são de 250°C e 280°C, respectivamente.
- Proceder à identificação dos picos cromatográficos com base nas comparações dos tempos de retenção de FAMES microbianos das amostras e de padrões comerciais (ex. BAME e FAME 37, Supelco).

Comentários dos autores

- Utilizar luvas descartáveis de nitrila durante todo o procedimento.
- As adições de solventes orgânicos, ácidos e bases, assim como a transferência da fase orgânica entre tubos, devem ser feitas em capela de exaustão.
- Embora o uso de pipetas de Pasteur para adição de solventes orgânicos e a aspiração e transferência da fase orgânica entre tubos tenha sido recomendado por diversos autores, o uso de micropipetas com ponteiros de alta qualidade não resulta em contaminação das amostras.
- O uso de rotores para tubos de 50 ml equipados com adaptadores de borracha para tubos de 35 ml, ao invés de rotores de 35 ml, é fortemente recomendado para minimizar o risco de quebra dos tubos de vidro durante a centrifugação.
- Caso haja interesse em analisar a composição dos FAMES dos lípidios neutros, a fração eluída com clorofórmio deverá ser coletada separadamente da fração eluída com acetona e tratada para a produção de FAMES de modo idêntico ao utilizado para a fração fosfolípídica.



Tabuleiros Costeiros



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

