

Simpósio de Integração Acadêmica

“Ciências Básicas para o Desenvolvimento Sustentável”

SIA UFV 2023



AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO PARA AMOSTRAGEM DE MICROBIOTA DE PEIXES

Maxwell Petrato Caixeiro, Lutecia Rigueira Medina, Paulo Wilson Goulart, Jorge Abdala Dergam, Cynthia Canêdo da Silva
Formol, peixes, bactérias

Introdução

A etapa de coleta e conservação de animais para pesquisas é um processo minucioso, que exige cuidado até o processamento destes em bancada. A fixação do tecido animal é uma ação para manter a amostra em condições ideais por longos períodos em museus e coleções (ABRAHÃO, 2004).

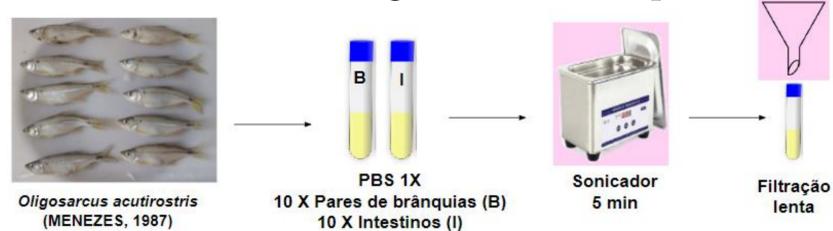
Após a eutanásia, um dos processos de fixação mais utilizados consiste em submergir as peças em formaldeído 10% por 48 horas (FOX, 1985). No entanto o manejo dessa forma não garante que mantenha o campo amostral da microbiota adequado para trabalhos de biologia molecular. Isto posto, esta pesquisa busca elucidar a obtenção do material genômico de amostras fixadas em formol através dos peixes como modelo alvo.

Objetivos

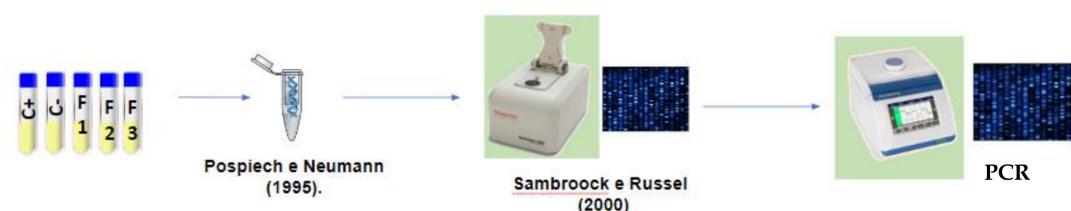
Analisar o DNA obtido e verificar sua viabilidade quanto à qualidade e a quantidade extraído de culturas com formol 10% (v/v) bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* como teste preliminar. Avaliar o DNA microbiano de brânquias e intestino de peixes da espécie *Oligosarcus acutirostris*.

Material e Método

Obtenção de material microbiológico em tecido de peixes fixados



Extração, qualificação e quantificação de DNA.



Apoio financeiro e Agradecimento



Resultados e Discussão

O DNA do teste preliminar de cultivo com formol 10% (v/v) apresentou bons valores em nanodrop evidenciando a possibilidade de DNA estável. Dessa forma seguimos para extração com material obtido em peixes.

Figura 1A: Gel de agarose 1% com DNA extraído do produto de sonicação do tecido de peixes. **Figura 1B:** Produto de PCR com DNA da microbiota de peixes em gel de agarose 1%.

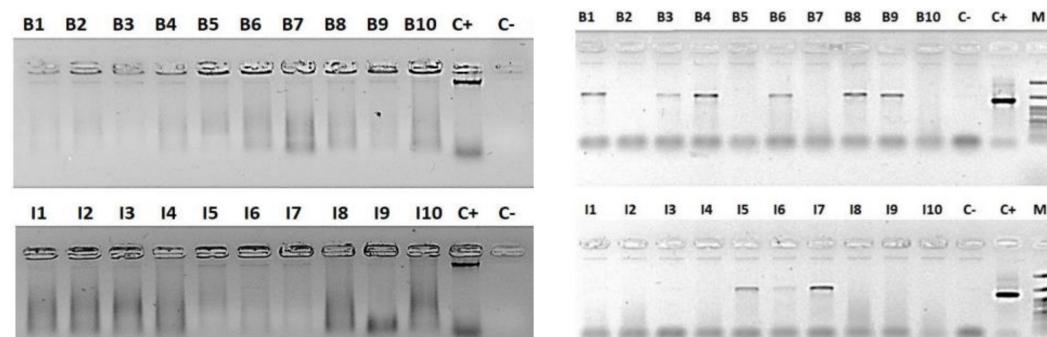


Figura 1A

Figura 1B

A extração de DNA da microbiota em peixes apresentou concentrações ideais, mas valores de absorbância em nanodrop diferentes do recomendado em literatura. Contudo, as amostras obtidas foram suficientes para obter amplicons de PCR utilizando primers 10F e 1100R com baixa variação comparada ao controle em intestino (I) e brânquias (B).

Conclusões

O tempo de sonicação do tecido animal pode ser maior para elevar a concentração de DNA obtido. O material obtido da sonicação necessita de lavagens com PBS 1X e a extração de DNA deve ter uso de proteinase K por 30 minutos e lavagens com etanol 70% (v/v) a -20°C. Além disso, é necessário o uso de Speed Vacum para concentrar os produtos de PCR e melhorar sua visualização em gel de agarose.

Bibliografia

- ABRAHÃO, Daniel S et al. A comparative study on several fixatives applied in transmission electron microscopy procedure. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 63, n. 2, p. 248-54, 2004.
- FOX, C. H. et al. Formaldehyde fixation. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, v. 33, n. 8, p. 845-853, 1985.
- POSPIECH, Andreas e NEUMANN, Björn. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Trends in Genetics, v. 11, n. 6, p. 217-218, 1 Jun 1995.