



## Microbiologia de Solo e Sedimento

### DIVERSIDADE BACTERIANA DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL IMPACTADO POR ÓLEO CRU

LUCIANA F. REYES<sup>1\*</sup>; DANIELLA V. LIMA<sup>2</sup>; VIVIAN PELLIZARI<sup>2</sup>; ITAMAR S. MELO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PPG Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP;

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP;

<sup>3</sup>Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. E-mail: reyes.luciana@gmail.com

**INTRODUÇÃO:** Manguezais são ecossistemas costeiros que ocorrem na transição entre os ambientes terrestre e marinho, ao longo das regiões tropicais e subtropicais, sofrendo influência direta das marés (Ke *et al.*, 2002). Possuem extrema sensibilidade à poluição e são freqüentemente expostos à contaminação por petróleo e derivados. O principal processo para a eliminação de hidrocarbonetos de um ambiente é a degradação microbiana destes compostos (Tam *et al.*, 2002). O conhecimento detalhado do mecanismo de ação de genes catabólicos aperfeiçoará o entendimento da funcionalidade microbiana e dos processos degradativos que ocorrem no meio ambiente, auxiliando no planejamento de novas estratégias de biorremediação (Junca & Pieper, 2003). A aplicação da técnica de DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) permite avaliar e comparar a diversidade de microrganismos presentes num ecossistema, onde cada banda observada no gel representa, teoricamente, uma seqüência de DNA e, portanto, uma população microbiana (Dabert *et al.*, 2002).

**OBJETIVOS:** Avaliar a diversidade bacteriana cultivável e não-cultivável de sedimento de manguezal (Bertioga/SP) quando submetido à fermentação seletiva em meio de sais e naftaleno, e verificar a presença de genes catabólicos.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Amostras de sedimento do manguezal de Bertioga/SP – Brasil, foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de um amostrador de aço cilíndrico, sendo representadas por seções de 0-5 (A), 5-10 (B) e 10-20 (C) cm cada (Cury, 2002 - modificado). A fermentação seletiva foi realizada em 500 mL e meio mínimo de sais, 10 g de sedimentos, 0,1% de naftaleno, 2% NaCl, 150 rpm a 28°C e incubação de 15 dias. Posteriormente, foram transferidas, por 2 vezes consecutivas, alíquotas de 20% do caldo de cultura para o mesmo meio nas condições descritas. O isolamento bacteriano foi realizado em meio NA+2% NaCl e a identificação pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (MIDI-FAME) de acordo com o manual do equipamento Agilent, modelo 7683 e programas *ChemStation* A0901[1206] e *Sherlock* 4.0. Estes isolados foram verificados quanto a presença de genes catabólicos monooxigenases (ALK) e dioxigenases ( $\alpha$ -ARHD2). Ainda, a comunidade bacteriana foi avaliada por DGGE, utilizando-se kit *MoBio UltraClean soil DNAa Extraction* para extração do DNA total das amostras (0,5g sedimento) e realizando-se a amplificação do fragmento do gene 16S rDNA com os *primers* 243F e R1387 (Heuer *et al.*, 1997).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Das 22 linhagens bacterianas isoladas seletivamente em naftaleno (profundidade A=7, B=6, C=9 isolados), somente 6 foram identificadas por FAME, pois, segundo instruções dos programas utilizados nesta análise, IS superiores a 7,0 devem ser considerados para identificação. Ainda, não foi possível a realização desta análise para 3 isolados visto que estas não cresceram em tempo hábil para a realização do procedimento exigido, que é de 24±1hs. Para os genes catabólicos testados, 9 isolados possuem o gene ALK,



## Microbiologia de Solo e Sedimento

monooxigenase com habilidade em degradar alcanos, mas nenhum isolado apresentou o gene  $\alpha$ -ARHD2, dioxigenase responsável pela hidroxilação de anéis aromáticos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Identificação dos isolados bacterianos do sedimento de manguezal de Bertiooga/SP e presença de genes de degradação  $\alpha$ -ARHD2 e ALK.

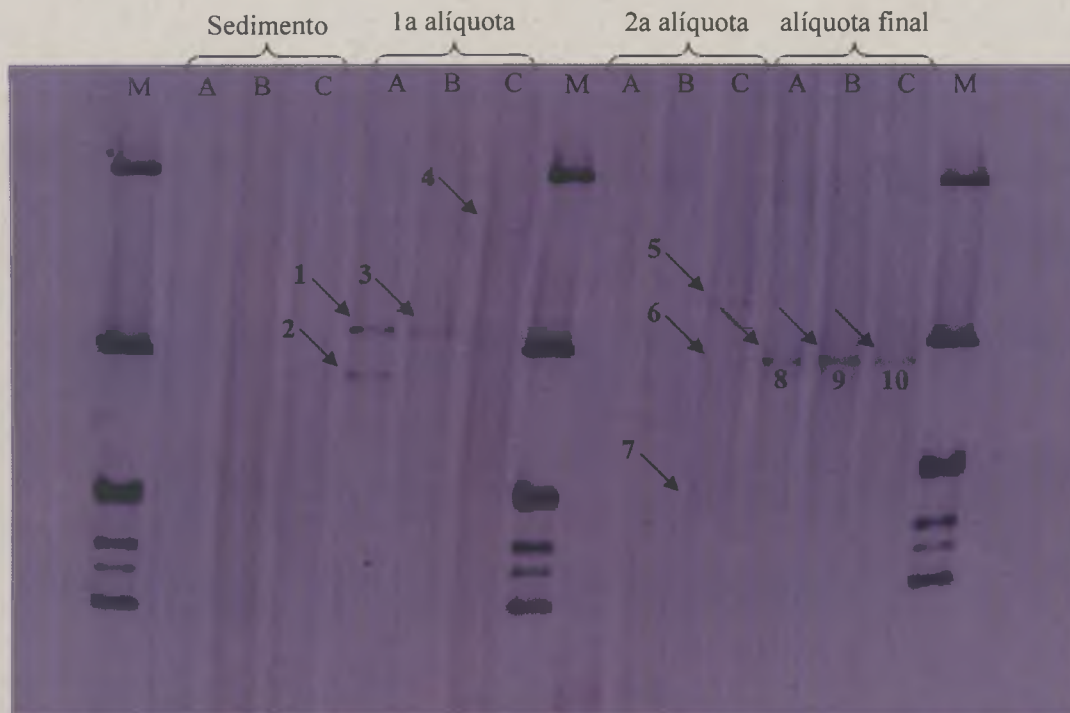
Isolado	Identificação	IS	ALK	$\alpha$ -ARHD2
MB-P3A-49	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,842	-	-
MB-P3A-50	NI	-	+	-
MB-P3A-51	NI	0,224	-	-
MB-P3A-52	NI	0,458	-	-
MB-P3A-53	NI	-	-	-
MB-P3A-54	NI	-	-	-
MB-P3A-55	NI	0,586	+	-
MB-P3B-56	<i>Shewanella putrefaciens</i>	0,861	+	-
MB-P3B-58	NI	0,370	-	-
MB-P3B-59	NI	0,572	+	-
MB-P3B-61	<i>Shewanella putrefaciens</i>	0,873	-	-
MB-P3B-62	NI	0,478	-	-
MB-P3B-63	NI	0,547	+	-
MB-P3C-64	NI	0,264	+	-
MB-P3C-65	NI	0,429	+	-
MB-P3C-66	<i>Rhodococcus rhodochrour</i>	0,809	+	-
MB-P3C-67	NI	0,222	-	-
MB-P3C-68	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,793	-	-
MB-P3C-69	NI	0,155	-	-
MB-P3C-70	NI	0,690	-	-
MB-P3C-71	NI	0,225	-	-
MB-P3C-72	<i>Microbacterium barkeri</i>	0,704	+	-

Onde: IS = Índice de Similaridade MIDI-FAME; NI = Não identificado por MIDI-FAME

A análise de DGGE de amostras ambientais fornece uma visão geral da comunidade microbiana e de seu comportamento quando submetida a condições adversas. Verifica-se, na Figura I, que houve grande flutuação da comunidade bacteriana nos diferentes perfis de profundidade avaliados (A, B e C) e, também, no decorrer das diferentes alíquotas da fermentação seletiva em naftaleno. Contudo, é possível observar que o perfil de bandas da alíquota final (pré-plaqueamento) tende a assemelhar-se para as 3 profundidades. Segundo Lindstrom e colaboradores (1999), em ambientes contaminados por longos períodos, as espécies dominantes estão presente em menor diversidade, porém, possuem grande versatilidade catabólica, pois sofreram processos de aclimatização e adaptação ao ambiente contaminado (Tam *et al.*, 2002). No presente momento, as bandas numeradas (1 a 10) foram submetidas a sequenciamento do gene 16S rDNA para identificação.



### Microbiologia de Solo e Sedimento



**Figura I.** Análise da comunidade bacteriana de sedimento de manguezal (Bertioga-SP) após fermentação em meio mínimo e naftaleno. M=marcadores de corrida; A=0-5cm, B=5-10cm, C=10-20cm profundidade; 1a, 2a, alíquota final = alíquotas da fermentação seletiva em naftaleno.

**CONCLUSÕES:** Microrganismos provenientes de sedimentos de manguezais, habéis em crescer na presença de petróleo e derivados, são interessantes para estudos relacionados a biodegradação destes contaminates e a presença de genes catabólicos, uma vez que estes são adaptados às condições adversas destes ecossistemas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dabert, P.; Delgenès, J. P.; Moletta, R.; Godon, J. J.. Contribution of molecular microbiology to the study study in water pollution removal of microbial community dynamics. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*. 2002. v.1, p. 39-49.
- Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E.M.H. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. and Environ. Microb.* 1997. v. 63, p. 3233-3241.
- Junca, H. & Pieper, D. H. Amplified Functional DNA Restriction Analysis to Determine Catechol 2,3-Dioxygenase Genes Diversity in Soil Bacteria. *J. of Microb. Met.* 2003. v. 55, p. 697 – 708.
- Ke, L.; Wong, T. W. Y.; Wong, A. H. Y.; Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y. Fate Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (Pah) Contamination in a Mangrove Swamp in Hong Kong Following an Oil Spill. *Marine Pollution Bulletin*. 2002. v. 45, p. 339 – 347.
- Lindstrom, J. E.; Barry, R. P., Braddock, J. F. Long-Term Affect of Microbial Communities after a Subartic Oil Spill. *Soil Biol. Biochem.* 1999. v. 31, p. 1677-1689.
- Tam, N. F. Y., Guo, C. L. Yan, W. Y. & Wong, Y. S. Preliminary Study on Biodegradation of Phenanthrene by Bacteria Isolated from Mangrove Sediments in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*. 2002. v. 45, p. 316 – 324.