



Microbiologia de Solo e Sedimento

DIVERSIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE *Rhizophora mangle* EM MANGUEZAL PRESERVADO E IMPACTADO

SARAH P. CANOVA^{1*}; ARMANDO C. F. DIAS²; RICARDO HARAKAVA³; FERNANDO D. ANDREOTE⁴; ITAMAR S. MELO⁴

¹PPG Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP; ²Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP; ³Instituto Biológico, São Paulo, SP; ⁴Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. E-mail: sarahcanova@yahoo.com.br

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 do regime das marés. No Brasil, a vegetação dos manguezais é representada pelos gêneros *Rhizophora*, *Laguncularia* e *Avicennia*. No gênero *Rhizophora* encontra-se o mangue vermelho, *R. mangle* (Família Rhizophoraceae) (GAMERO, 2001 e CURY, 2002). A comunidade microbiana é fundamental neste sistema, onde está envolvida na ciclagem de nutrientes. A rizosfera é definida como a camada do solo que é influenciada pelo metabolismo das raízes, o que constitui um nicho amplamente rico em microrganismos devido à exsudação de nutrientes radiculares (BERG *et al.*, 2005). Neste, podemos encontrar as actinobactérias, que são Gram-positivas, organizam-se de forma filamentosa e muitas vezes ramificada. Estas bactérias produzem cadeia de esporos, e são em sua grande maioria aeróbias. Comumente encontradas nos solos, as actinobactérias se adaptam às diversas condições do ambiente, produzem antibióticos e são capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos das plantas, na forma de endófitos (de ARAÚJO *et al.*, 2000).

OBJETIVOS: Avaliar a diversidade de actinobactérias rizosféricas de *R. mangle* em dois manguezais do estado de São Paulo (Ilha do Cardoso-Cananéia e Bertioga).

MATERIAL E MÉTODOS: Para o isolamento de actinobactérias da rizosfera, amostras de solos aderidos às raízes foram coletadas da superfície destas, até perfazer 1g de solo por planta, que foi suspenso em 9 mL (1:10) de água destilada esterilizada e homogenizado, em seguida, foram submetidas a uma diluição em série em solução salina (10^{-1} a 10^{-5}), semeados em placas contendo o meio de cultivo Amido-Caseína-Ágar (ACA), seletivo para actinobactérias. Após a purificação, os isolados foram submetidos a análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (MIDI-FAME) de acordo com o manual do equipamento da Agilent, modelo 7683 e programas *ChemStation A0901[1206]* e *Sherlock 4.0*. As linhagens que não tiveram similaridade desejada, foram identificadas utilizando o gene 16S rDNA (Andreote, 2007).

Adicionalmente ao isolamento, a diversidade de actinobactérias foi avaliada de maneira independente de cultivo. Para isto, o DNA presente em 0,5g de rizosfera foi extraído com o kit *MoBio UltraClean soil DNAa Extraction* e submetido à amplificação do fragmento do gene 16S RNAr de actinobactérias, realizada com os *primers* 243F e R1387 (Heuer *et al.*, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de actinobactérias em manguezais e em outros ecossistemas marinhos tem sido pouco documentada, embora esse grupo tenha sido encontrado abundantemente em diversos ecossistemas. Neste trabalho, foi possível isolar 11 linhagens de actinobactérias, a partir de amostras de rizosfera de *R. mangle* presentes no manguezal localizado na cidade de Cananéia, enquanto que numa amostragem similar no manguezal de Bertioga, apenas três isolados foram



Microbiologia de Solo e Sedimento

obtidos. Este pequeno número de isolados obtidos, quando comparados aos encontrados na rizosfera de culturas convencionais pode ser justificado pela baixa quantidade de oxigênio na rizosfera das plantas de manguezais, que são ecossistemas alagados. Dessa forma, por serem microrganismo com alta capacidade adaptativa, as actinobactérias conseguem sobreviver na região próxima às raízes das plantas que liberam o oxigênio oriundo do seu metabolismo no sedimento do manguezal.

Dos 14 isolados obtidos, 5 foram caracterizadas por meio de FAME, sendo verificada a principal afiliação ao gênero *Streptomyces*, com exceção de um isolado, que não foi identificado. Contudo, como os índices de similaridade de alguns isolados apresentados nesta análise foram baixos (inferior a 0,3), sete isolados foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, dos quais cinco tiveram similaridade satisfatória com as seqüências presentes no banco de dados do GenBank (Tabela1).

Tabela 1. Identificação dos isolados de actinobactérias isoladas da rizosfera de *R. mangle* presentes nos manguezais de Bertioga e Cananéia.

| Locais de Coleta | Codigos | Identificação | Similaridade | Técnica |
|------------------|---------|----------------------------------|--------------|----------|
| Cananéia | AMC1 | <i>Streptomyces fulvorobues</i> | 96,1 | 16S rDNA |
| | AMC3 | <i>Streptomyces rubrogriseus</i> | 97,5 | 16S rDNA |
| | AMC16 | <i>Streptomyces afghniensis</i> | 96,9 | 16S rDNA |
| | AMC22 | <i>Streptomyces halstedii</i> | 0,27 | MIDI |
| | AMC23 | <i>Streptomyces griseus</i> | 92 | 16S rDNA |
| | AMC24 | - | - | - |
| | AMC25 | <i>Streptomyces griseus</i> | 97,5 | 16S rDNA |
| | AMC39 | <i>Streptomyces rochei</i> | 0,27 | MIDI |
| | AMC40 | Não identificado | | MIDI |
| | AMC41 | <i>Streptomyces rochei</i> | 0,36 | MIDI |
| | AERC-1 | <i>Streptomyces griseus</i> | 92 | 16S rDNA |
| Bertioga | 22b | - | - | - |
| | AMB26 | <i>Streptomyces virginiae</i> | 96,9 | 16S rDNA |
| | AMB12 | Não identificado | | MIDI |

A análise de amostras de rizosfera por meio de DGGE específico para actinobactérias mostrou importantes pontos da diversidade desde grupo na rizosfera de *R. mangle*. Além de suprir informações não consideradas quando apenas o isolamento é utilizado, esta análise fornece uma visão geral da comunidade em cada uma das amostras avaliadas. Inicialmente, é possível observar a distinção das comunidades de actinobactérias presentes nos manguezais. Esta diferença se deve ao fato da contaminação por petróleo, que ocorre no manguezal de Bertioga. No entanto, além desta diferença entre as localidades, uma variação entre as amostras obtidas em diferentes regiões do mesmo manguezal é encontrada. Os perfis obtidos em amostras de franjas diferem daquelas obtidos na área central do manguezal e da restinga. Tais diferenças são mais evidentes no manguezal de Cananéia, sugerindo que a seleção que ocorre devido à contaminação por óleo, é maior do que a seleção que ocorre devido a variações encontradas dentro de um mesmo manguezal. Adicionalmente, observando que os pontos de franja mostram similaridade entre os dois manguezais, pode-se sugerir o efeito das marés na composição da comunidade de actinobactérias na rizosfera de *R. mangle* que se desenvolvem na área de franja dos manguezais.



Microbiologia de Solo e Sedimento

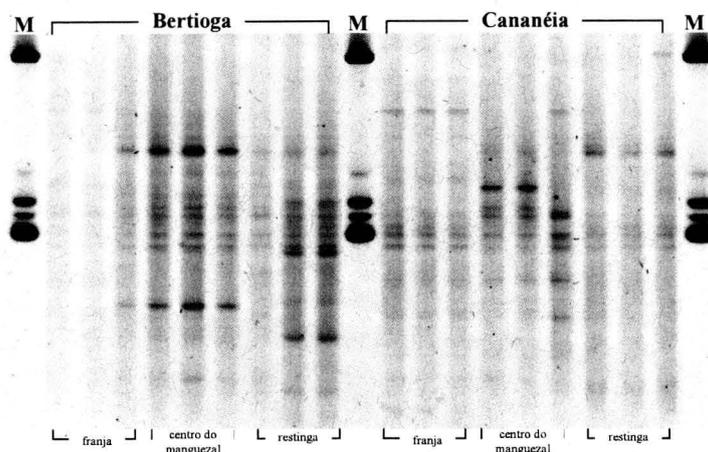


Figura 1. Análise da comunidade rizosférica de actinobactérias em plantas de *R. mangle* localizadas nos manguezais de Bertioga e Cananéia. M indica os marcadores de corrida, enquanto que os nomes na figura identificam as amostras presentes em cada *fingerprinting*.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitem concluir que a comunidade de actinobactérias na rizosfera de *R. mangle* é pequena e pouco diversa. No entanto, esta comunidade é altamente responsiva às alterações ambientais, que podem ocorrer naturalmente, ou devido à ação antrópica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTE, F.D. Identificação de bactérias pelo sequenciamento do gene 16S ribossômico (16S rDNA). In: ROSA MARIA VALDEBENITO SANHUEZA; ITAMAR SOARES DE MELO (Ed.). **Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007, p. 67-74.
- BERG, G., EBERL, L., HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**. 7(11):1673-1685. 2005.
- CURY, J. C. Atividade Microbiana e Diversidade Metabólica e Genética em Solo de Mangue Contaminado com Petróleo. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2002. Piracicaba – SP, pp. 84.
- de ARAUJO, J.M., da SILVA, A.C., AZEVEDO, J.L., Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Braz Arch Biol Technol**, v.43, p. 447 – 451, 2000.
- GAMERO, R. M. P. Mineralogia, Físico-química e classificação dos solos de mangue do rio Erice no canal de Bertioga (Santos, SP). Piracicaba, 2001. 78p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- 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. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.