INFLUÊNCIA DE HERBICIDAS SOBRE A ESTRUTURA DE COMUNIDADES BACTERIANAS BENTÔNICAS.

Cassiano Moreira (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Sônia Alvim Veiga Pileggi (Orientadora), e-mail: sonia.pileggi@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área: 2.00.00.00-6 – Ciências Biológicas
Subárea: 2.12.00.00-9 - Microbiologia

Palavras-chave: bactérias, organismos planctônicos, herbicidas, biorremediação.

Resumo

As bactérias se apresentam no ambiente como comunidades organizadas em diferentes graus de complexidade, principalmente na forma de biofilmes. A formação destas estruturas em ambiente aquático se inicia com a associação de bactérias planctônicas, tendo grande importância em processos de ciclagem de matéria orgânica, respiração e produção primária. Dessa forma, é importante compreender esse estágio inicial da formação de biofilmes. A caracterização das comunidades planctônicas em dois reservatórios, um em pré-aquecimento, outro em pós-aquecimento, contendo água de lavagem de embalagens de herbicidas, foi feita por meio de extração de DNA, sequenciamento em plataforma Illumina, e avaliação das sequências por meio de uma abordagem de metagenômica artificial. Os agrotóxicos presentes na água em ambos os reservatórios, e a alta temperatura no reservatório 2, tiveram efeitos seletivos direcionais sobre as comunidades planctônicas, levando a comunidades planctônicas distintas, em termos estruturais e funcionais, em cada um dos reservatórios.

Introdução

As bactérias apresentam-se nos ambientes aquosos tanto na forma planctônica quanto na forma séssil (Costerton et al., 1999), sendo que a maior parte da atividade bacteriana está concentrada em biofilmes (Kasnowski et al., 2010), e portanto se caracteriza como essencial em processos de ciclagem da matéria orgânica, respiração e produção primária, portanto na base da cadeia alimentar (Battin et al., 2016). Quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas do biofilme começam a liberar células em estado planctônico, que podem rapidamente dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em outros locais (Kasnowski et al., 2010). Assim, é de suma importância compreender a forma de vida dessas bactérias planctônicas, já que são elas as formadoras de biofilmes, com distintas características metabólicas e capazes de ciclar matéria orgânica (Davey et al., 2000).
Segundo Caldas et al. (2000), o uso de pesticidas é a principal estratégia para o combate e a prevenção de pragas agrícolas. Esses compostos, porém, são tóxicos a

organismos não alvos em outros ecossistemas, como o homem e a microbiota de solo. Desta maneira, devido à capacidade degradadora, os microrganismos vêm sendo empregados de forma significativa na eliminação ou redução dos níveis de pesticidas utilizados na agropecuária, como os herbicidas.
Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial para formação de biofilmes adaptados a ambientes contaminados, a partir da composição de famílias bacterianas planctônicas e de suas características metabólicas atribuídas por metagenômica artificial.

Materiais e Métodos

Coleta de material
As amostras foram coletadas em frascos de cultura onde se armazenou água utilizada para lavagem de embalagens de 30 agrotóxicos. As coletas foram realizadas na Fazenda-Escola Capão da Onça, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Foram coletadas amostras por meio de sistema de filtração utilizando membranas filtrantes de 0,22 µm de porosidade. As membranas assim obtidas foram estocadas a -20 ºC.

Extração do DNA
A extração foi realizada em triplicatas, utilizando-se o PowerSoil® DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc., Carlsbad, EUA).

PCR
As amostras de DNA obtidas foram submetidas a reações para amplificação das sequências correspondentes ao gene ribossomal 16S. Foram utilizados tampão de reação 1 x 1,5 mM de $MgCl_2$, dNTP 0,2 mM, 0,5 µM de forward primer, 0,5 µM de reverse primer e 0,02 U/µl de *Taq* polimerase, para 25 ng de amostra. Foi utilizado o seguinte programa para amplificação: 1 ciclo de 94 ˚C por 10 min, 30 ciclos de 94 ˚C por 1 min, 53.5 ˚C por 1 min, 72 ˚C por 1 min e 50 s; 1 ciclo de 72 ˚C por 7 min, 1 ciclo a 4 ˚C, infinito.

Eletroforese
As sequências amplificadas foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose. O gel de corrida foi preparado utilizando-se agarose a 0,8% com tampão TAE (Tris-Acetato-ácido etilenodiamino tetra-acético [EDTA]). O mesmo tampão foi utilizado para a corrida eletroforética. O preparo do material foi realizado da seguinte maneira: 4µL de corante azul de bromotimol, 5µL de *GelRed*®, 3µL da amostra. O controle foi montado com 3µL de *KbLadder*®. A corrida foi realizada com ~65 mA.

Sequenciamento do DNA
O material amplificado foi testado para integridade via eletroforese, sendo que entre 30 a 60 ng foram enviados para a University of Minnesota para sequenciamento em plataforma Illumina.

Avaliação da estrutura das bactérias planctônicas.
Os dados obtidos, em forma de identificação de gêneros até filos em proporções relativas, foram utilizados para pesquisa bibliográfica e metagenômia artificial para

caracterizar a estrutura populacional de bactérias componentes do ambiente planctônico, e também possíveis redes tróficas para degradação de herbicidas.

Resultados e Discussão

Com o sequenciamento de DNA de bactérias planctônicas presentes em dois reservatórios de água de lavagem de embalagens de herbicidas, um contento água antes de aquecimento para evaporação (M1, Fig. 1), e outro contendo água pós-tratamento térmico (M2, Fig. 2), foi possível caracterizar a biodiversidade planctônica, com aproximadamente 50 famílias diferentes.

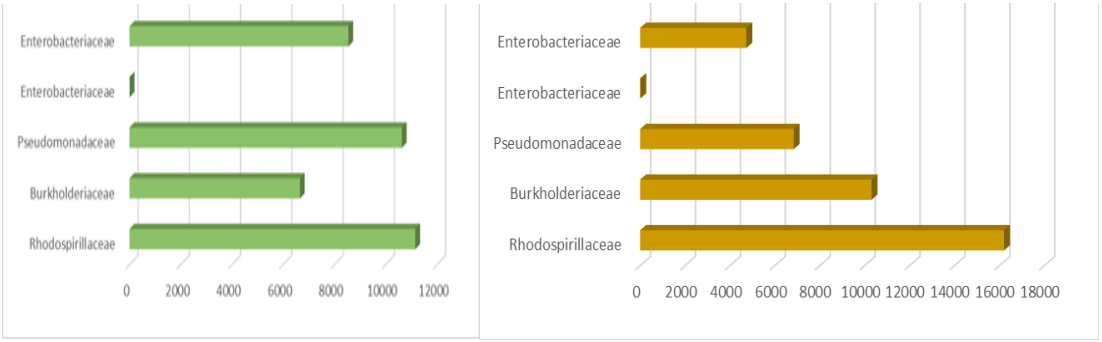


Fig. 1 - Biodiversidade das famílias de bactérias planctônicas presentes no reservatório de água de lavagem de herbicídas antes do aquecimento para evaporação (esquerda) e pós aquecimento para evaporação.

Nos dois reservatórios foi possível observar 4 famílias destacadas em termos de abundância: Enterobacteriaceae; Pseudomonadaceae; Burkholderiaceae e Rhodospirillaceae. Estas famílias são encontradas normalmente em solo, água, plantas, seres humanos e animais.
Os dados de metagenômica artificial foram categorizados de acordo com os tipos de processos codificados: transporte e catabolismo; motilidade celular; crescimento e morte celular (Fig. 2); e moléculas de sinalização e interação (Fig. 3).

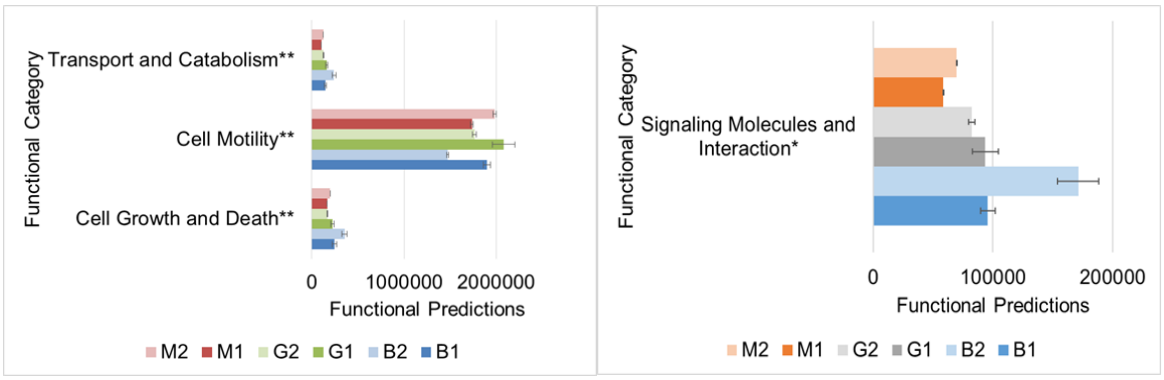


Fig. 2 - Resultados das análises por metagenômica artificial apresentando diferenças entre as categorias funcionais: transporte e catabolismo, motilidade celular e crescimento; e morte celular e moléculas de sinalização e interação dos 3 tipos de reservatórios (M1 e M2, comunidades planctônicas pré aquecimento e pós aquecimento, respectivamente).

Em todas as categorias funcionais apresentadas nas Fig. 2 e 3, a comunidade M2 apresentou um maior número de genes atribuídos do que M1, indicando que o fator temperatura teve um papel seletivo importante, principalmente para o aumento da abundância da família Burkholderiaceae e Rhodospirillaceae em relação às outras duas discutidas neste trabalho. Nestas figuras são mostradas outras comunidades avaliadas em outros projetos.

Conclusões

Após a identificação da biodiversidade e da funcionalidade prevista das comunidades planctônicas dos reservatórios 1 e 2 de água de lavagem de embalagens de herbicidas, nota-se que houve uma redução no número de famílias após a seleção por altas temperaturas, restringindo a abundância principalmente nas famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae. Processos de competição e cooperação podem estar atuando na seleção das famílias Burkholderiaceae e Rhodospirillaceae, que não tiveram alterações significativas em abundância após o aquecimento da água no reservatório. Os dados de metagenômica artificial mostraram que existe um maior número de genes associados com categorias funcionais na comunidade planctônica do reservatório pós-aquecimento, indicando um maior potencial adaptativo e também biotecnológico destas comunidades.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa de IC.

Referências

BATTIN, T. J.; BESEMER, K.; BENGTSSON, M. M.; ROMANI, A. M.; PACKMANN, A. I. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. Nature Reviews – Microbiology, v. 14, p. 251-263, 2016.

CALDAS, E. D.; KENUPP, L. C. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. Revista de Saúde Pública; v. 34, n. 5, 2000.

COSTERTON, J. W.; PHILIP, S. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfície. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v. 15, p. 1-23, 2010.

TRAUB, W. H.; RAYMOND, E. A.; LINEHAN, J. Identificação de Enterobacteriaceae no Laboratório de Microbiologia Clínica. Microbiologia Aplicada, v. 20, n. 3, p. 303-308, 1970.