ESTRUTURA POPULACIONAL DE BACTÉRIAS FORMADORAS DE BIOFILME EM ÁGUA CONTAMINADA POR HERBICIDAS

Jhenifer Yonara de Lima (PIBIC/CNPq/UEPG), Marcos Pileggi (Orientador), e-mail: pileggimarcos@gmail.com.

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

Área: 2.00.00.00-6
Subárea: 2.12.00.00-9

Palavras-chave: Metagenômica, quorum sensing, biorremediação.

Resumo

Os reservatórios de água de lavagem de embalagens de herbicidas são ambientes estressantes para microrganismos pela alta taxa de contaminantes químicos e alta temperatura de evaporação. Neste ambiente, os microrganismos podem se organizar em biofilmes, que são estruturas compostas por uma matriz gelatinosa, e interagir metabolicamente por meio do *quorum sensing*. O objetivo deste trabalho foi relacionar a estrutura filogenética de bactérias formadoras de biofilme com possíveis adaptações a ambientes contaminados com herbicidas. Amostras de biofilme foram coletadas dos reservatórios já citados e submetidas à extração de DNA, sequenciamento e metagenômica artificial. Foram identificados gêneros e famílias de bactérias componentes do biofilme dos reservatórios, cuja maioria está vinculada a plantas e possuem genes relacionados com a formação de biofilme, tolerância ao estresse e biodegradação, portanto com alto potencial adaptativo a condições de estresse e para utilização em biorremediação.

Introdução

A organização das bactérias em biofilmes pode alterar diferentes funções nas populações e células individuais componentes destas estruturas, podendo conferir resistência a microbicidas e capacidade de biorremediação, mesmo em condições consideradas extremas, como proximidades de fontes hidrotermais (PURSWANI et al, 2017).
A maturação do biofilme é mediada pela produção de auto transportadores e de EPS, as quais formam uma estrutura tridimensional bastante característica ao biofilme, no qual o quorum sensing detém o papel principal (ZUBERI; MISBA; KHAN, 2017; BROWN et al, 2017).
Lerch et al (2017) demonstraram que biofilmes tem maior capacidade de remover agrotóxicos do meio por permitirem a manutenção da atividade catalítica ao longo de extensos períodos de tempo. Assim, foi avaliada a estrutura populacional e potencial metabólico de biofilmes em tanques contendo água de lavagem de embalagens de herbicidas, com o objetivo de se entender os potenciais adaptativo e biotecnológico destas comunidades.

Materiais e Métodos

Coleta das amostras de Biofilme.

As amostras foram coletadas de reservatórios onde armazenou-se água utilizada para lavagem de embalagens de 30 agrotóxicos diferentes, na Fazenda Capão da Onça, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. As amostras foram coletadas com auxílio de swabs estéreis, diluídas em 1 mL de solução salina (0,9% de NaCl) e estocadas a 4 ºC.

Extração do DNA.

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

Sequenciamento do DNA.

O material obtido na extração foi testado para integridade via eletroforese e 30 a 60 ng foram enviados para a University of Minnesota (St. Paul, Minnesota, EUA) para sequenciamento na plataforma Illumina.

Avaliação da estrutura populacional de bactérias do biofilme e bioinformática

Os programas utilizados no processamento das sequências obtidas estão descritos em Staley et al., 2015. As atribuições taxonômicas foram feitas contra *Ribosomal Database Project* ver. 14 (COLE et al., 2009).

Resultados e Discussão

Os dados sobre riqueza e abundância de famílias bacterianas nos reservatórios B1 (pré-aquecimento) e B2 (pós-aquecimento) estão representados nas Figs. 1 e 2. Os tanques são considerados ambientes estressantes pela carga tóxica para os microrganismos, mas com uma pressão seletiva adicional que ocorreu somente em B2, a alta temperatura para evaporação de água, que culminou com uma redução na biodiversidade neste nicho.
As famílias mais abundantes em B1 (Fig. 1) foram Pseudomonadaceae e Xanthomonadaceae, caracterizadas como endofíticos ou fitopatógenos; e Sphingomonadaceae, Burkholderiaceae e Rhodospirilaceae, com alto potencial na biorremediação e biodegradação de agrotóxicos. Em B2 (Fig. 2) observa-se a redução das famílias abundantes em B1 e dominância de Enterobacteriaceae e Moraxellaceae, relacionadas com processos de biodegradação e biorremediação.

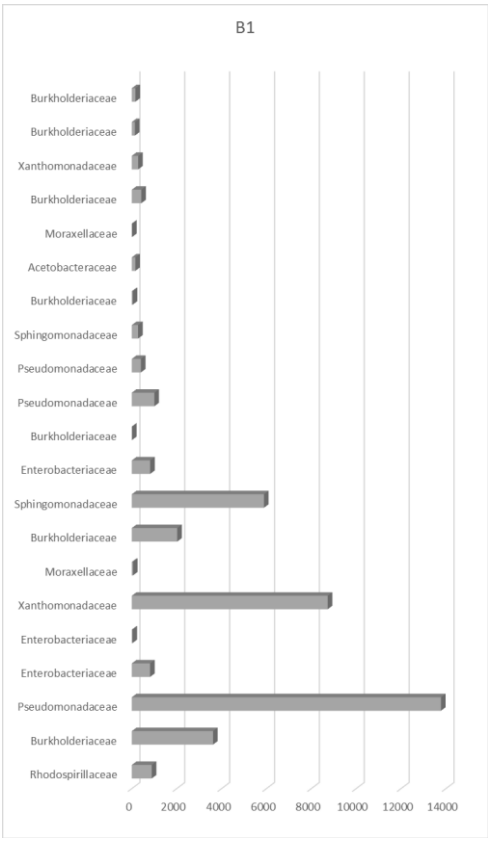


Figura 1: Diversidade de familias e suas respectivas abundâncias em biofilme formado em tanque pré aquecimento.

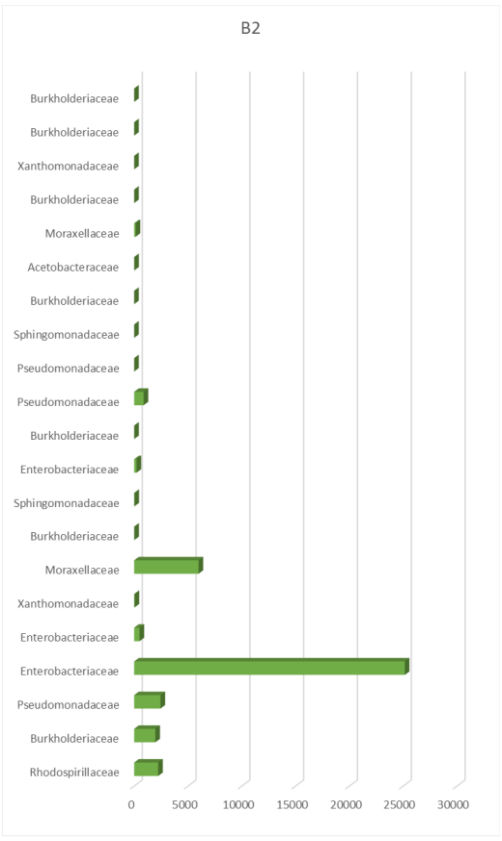


Figura 2: Diversidade de familias e suas respectivas abundâncias em biofilme formado em tanque pós aquecimento.

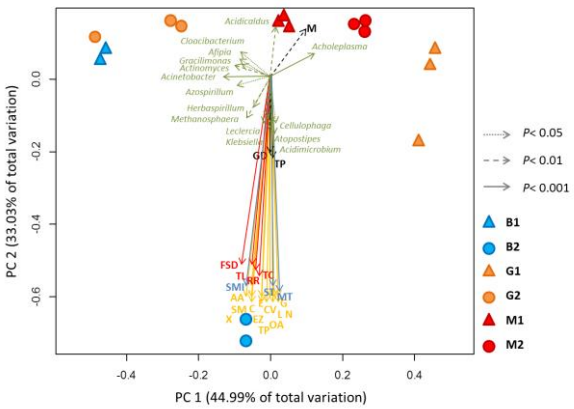


Figura 3: Ordenação de nichos com base na abundância de OTU pela aborgagem estatística de Escalada Multidimensional. Gêneros bacterianos (verde), processos genéticos (vermelho), processos celulares (preto), processos ambientais (azul) e rotas metabólicas (amarelo) com *P* <0.05 para significância depois de 999 permutações exibidas. Cada vetor aponta para a direção de aumento para uma dada variável e seu comprimento indica a força da correlação entre a variavel e os scores de ordenação. Legenda: M: Motilidade; GD: Crescimento e Morte; TP: Transporte e Catabolismo; MT: Transporte de Membrana; SMI: Interação de Moléculas Sinalizadoras; ST: Transdução de Sinal; TL: Tradução; TC: Transcrição; RR: Replicação e Reparo; FSD: Seleção Flexível para Degradação; AA: Aminoácido; SM: Metabolitos Secundários; C: Carboidrato; E: Energia; EZ: Enzima; G: Glicano; L: Lipídios; CV: Cofactores e Vitaminas; OA: Outros Aminoácidos; TP: Terpenóides e Policetidos; N: Nucleotídeos; XB: Degradação de Xenobióticos.

A comunidade B2 possui a maior atribuição de genes relacionados com o metabolismo de lipídeos e proteínas (Fig. 3), que podem estar relacionados com a reorganização do nível de saturação de lipídeos e permeabilidade de membranas. Este processo de seleção por temperatura foi um passo fundamental para a formação da comunidade B2, que ainda possui características importantes para a estruturação de biofilmes em ambiente contaminado por herbicidas, como genes relacionados com degradação de açúcares, produção de energia e degradação de xenobióticos (Fig. 3)

Conclusões

Os reservatórios de água utilizada na lavagem de embalagens de herbicidas são um ambiente estressante para bactérias devido à presença de substâncias tóxicas. De acordo com os dados obtidos, a comunidade B2, apresenta um maior potencial metabólico.
O aquecimento e composição tóxica da água devem ter atuado como agentes seletivos, formando uma microbiota com alta capacidade de degradação de herbicidas. Apenas dois gêneros bacterianos identificados por sequenciamento, *Acinetobacter* e *Enterobacter*, foram as dominantes no biofilme de reservatório após o aquecimento da água, com potencial de exploração biotecnológica, principalmente relacionado à biodegradação e biorremediação de herbicidas, mas também para estudos de evolução e adaptação de bactérias em ambientes extremos.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida.

Referências

BROWN, Lindsey R. et al. Increased Zinc Availability Enhances Initial Aggregation and Biofilm Formation of *Streptococcus pneumoniae*. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology,** [s.l.], v. 7, p.1-12, 7 jun. 2017.
COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Res**, n. 37, p. D141–D145, 2009.
LERCH, Thomas Z. et al. Biofilm vs. Planktonic Lifestyle: Consequences for Pesticide 2,4-D Metabolism by *Cupriavidus necator* JMP134. **Frontiers In Microbiology,** [s.l.], v. 8, p.1-11, 23 maio 2017.
PURSWANI, Jessica et al. BSocial: Deciphering Social Behaviors within Mixed Microbial Populations. **Frontiers In Microbiology,** [s.l.], v. 8, p.1-11, 24 maio 2017.
STALEY C. et al. Evaluation of water sampling methodologies for amplicon-based characterization of bacterial community structure**. J Microbiol Methods**, v. 114, p. 43–50, 2015. doi: 10.1016/j.mimet.2015.05.003PURSWANI, Jessica et al. BSocial: Deciphering Social Behaviors within Mixed Microbial Populations. **Frontiers In Microbiology,** [s.l.], v. 8, p.1-11, 24 maio 2017.
ZUBERI, Azna; MISBA, Lama; KHAN, Asad U.. CRISPR Interference (CRISPRi) Inhibition of luxS Gene Expression in E. coli: An Approach to Inhibit Biofilm. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology,** [s.l.], v. 7, p.1-7, 26 maio 2017.