# IDENTIFICAÇÃO E CARATERIZAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS CULTIVÁVEIS PROVINDAS DE BIOFILME

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

Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEBIOGEM

**Microbiologia / Microbiologia aplicada**

**Palavras-chave:** Comunidade bacteriana, adaptação, tolerância

## Resumo

O biofilme é composto por microrganismos em uma estrutura organizada em uma secreção de matriz gelatinosa composta por polímeros e nutrientes relacionados com proteção, nutrição e fixação ao substrato. Neste trabalho, foram utilizados microrganismos isolados de biofilme de tanques contendo água de lavagem de embalagem de agrotóxicos, situação altamente estressante devido à presença de componentes tóxicos, alta temperatura e baixo pH. Tais condições podem ter selecionado microrganismos tolerantes e que possivelmente degradem os agrotóxicos a fim de obter energia ou eliminar agentes estressantes. Buscou-se identificar linhagens bacterianas cultiváveis coletadas a partir desse biofilme e caracterizá-las quanto ao comportamento frente a compostos tóxicos. Além do enfoque na aplicação em biorremediação de água contaminada com agrotóxicos, este modelo procura estudar a plasticidade enzimática bacteriana para sobrevivência em ambientes estressantes.

## Introdução

O aumento da aplicação de agrotóxicos aumentou a produção agrícola e o controle de pragas. Mas seu uso desordenado pode ocasionar a contaminação de solo e água. As embalagens dos produtos utilizados no campo são uma das principais fontes de contaminação, modificando composições populacionais da microbiota do solo e água e interferindo na dinâmica dos ciclos biogeoquímicos (PILEGGI et al. 2012).

A contaminação da água se tornou um tema discutido em diferentes âmbitos da ciência, sendo que a utilização de água para lavagem das embalagens de agrotóxicos merece destaque. O descarte é o destino mais comum destes rejeitos, sendo necessária a armazenagem em tanques e evaporação para diminuir o volume de água. É necessária uma intervenção para que esse resíduo possa ser viabilizado ou ter sua carga tóxica reduzida a níveis aceitáveis (INPEV, 2007).

A estrutura em biofilme bacteriano confere um arranjo espacial das células que facilita as interações como cooperação e competição. Estudos demonstram que biofilmes podem induzir mudanças nos níveis de degradação de herbicidas devido a modificações na comunidade que o compõe e em suas interações (LERCH et al. 2017). Portanto, os estudos sobre a adaptação dessas bactérias oriundas de biofilme de ambiente contaminado com herbicidas são necessários, pois além de levantar informações sobre a capacidade de resposta frente a esses compostos, pode permitir o desenvolvimento de produtos biotecnológicos (DOBRZANSKI et al. 2018). Logo, este trabalho buscou identificar e caracterizar a tolerância de linhagens

isoladas a partir da coleção de bactérias de biofilmes formados em tanques contendo água de lavagem de embalagem de herbicidas, e avaliar o potencial para utilização em biorremediação em água.

## Materiais e Métodos

*Teste de Tolerância em Microplacas:*
As linhagens bacterianas foram incubadas em microplacas de 96 poços em Caldo Luria (LB – 10 g/L triptona; 5 g/L NaCl; 5 g/L extrato de levedura), e com diferentes doses dos herbicidas (H) sulfentrazone (Boral) e saflufenacil (Heat). As placas foram incubadas a 30 °C, durante 48h. A densidade óptica foi avaliada através de leitor de microplacas a 600 nm.

*Identificação molecular por sequenciamento do gene ribossomal 16S:*
As linhagens bacterianas identificadas como tolerantes foram cultivadas em placas contendo Agar Luria (LA: LB com adição de 15 g/L agar bacteriológico). Após incubação a 30 ºC e 48h, uma colônia isolada foi coletada para identificação molecular. Foram utilizados os primers 8F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') para se fazer a amplificação do gene ribossomal 16S. Após foi realizada a purificação dos produtos de PCR e análise de integridade de bandas por meio de eletroforese.

*Avaliação de Crescimento:*
As linhagens com densidades ópticas mais altas nos Testes de Tolerância em Microplacas foram avaliadas para capacidade e modo de crescimento em meios seletivos a partir dos herbicidas estudados. As curvas de crescimento bacteriano foram obtidas utilizando os meios LB, contendo 0x, 1x e 40x a dose dos herbicidas já citados para cada tratamento. As linhagens foram incubadas a 30 ºC, 150 rpm, e as leituras em espectrofotômetro (600 nm) foram realizadas a cada hora durante um período de 24h. O pré inóculo foi transferido para cada tratamento com uma O.D inicial de 0,05 nm a 600 nm, sendo diluídas as amostras sempre que as leituras atingiam valores de 1,0, para minimizar os erros.

*Viabilidade Celular:*
As taxas de viabilidade celular foram obtidas em tempos correspondentes às fases inicial, média e final do crescimento logarítmico, conforme os resultados obtidos por meio da curva de crescimento. As linhagens foram cultivadas em meio líquido seletivo (LB+H) a 30 ºC, e foram retiradas alíquotas de 1 mL para cada horário da fase de crescimento logarítmico. As amostras foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) e plaqueadas em meio LA a 30 ºC, por 24 h. Foram realizadas as contagens de unidades formadoras de colônia (UFC).

## Resultados e Discussão

*Teste de Tolerância em Microplacas:*
Este teste foi realizado para avaliar a capacidade das linhagens escolhidas em se desenvolver no meio estressante (LB+H). Foram escolhidas as linhagens 9.6, 9.9 e 10.3 por terem melhor desenvolvimento nos tratamentos analisados, apresentando valores de D.O. maiores que 1,0 a 600 nm.

*Identificação molecular por sequenciamento do gene ribossomal 16S:*

O DNA foi extraído de acordo com o método descrito, entretanto a amplificação por PCR não está gerando os resultados esperados. Portanto não se pôde enviar as amostras para o sequenciamento e as linhagens permanecem sem identificação molecular.

*Avaliação de Crescimento:*
Foi realizada a avaliação de crescimento das três linhagens previamente selecionadas e que apresentaram D.O. acima de 1,0 com melhor capacidade de crescimento. Após analisar os dados obtidos, pode-se notar que as linhagens isoladas a partir de biofilme apresentam um sistema de resposta eficiente frente a diferentes doses dos herbicidas Boral e Heat, com equivalências nas taxas de crescimento entre controle e tratamentos com herbicidas. A partir das curvas de crescimento, obteve-se os horários da fase de crescimento logarítmico para cada linhagem.

*Viabilidade Celular:*
A partir da observação das curvas de crescimento das três linhagens e da seleção dos horários da fase de crescimento logarítmico pode-se realizar uma análise exploratória com relação à viabilidade celular das três linhagens em cada tratamento a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para cada condição da linhagem, observado na figura 1.

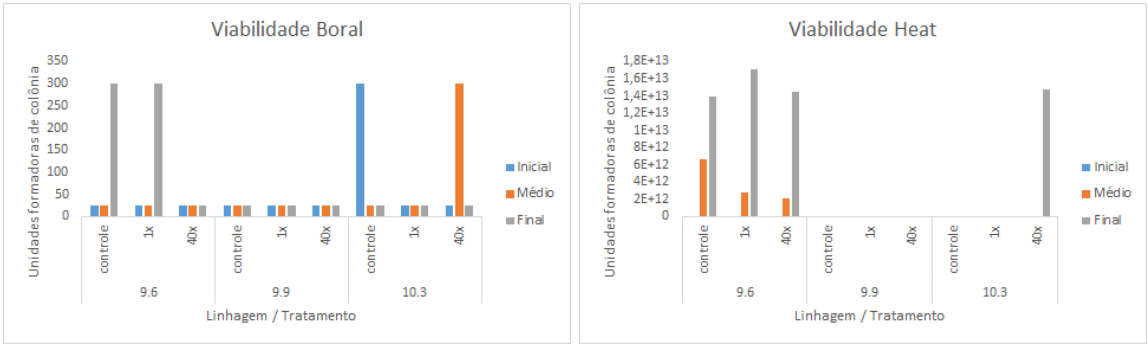



Figura 1 - Dados de viabilidade celular por contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) das linhagens 9.6, 9.9 e 10.3 nos horários inicial, médio e final correspondentes ao crescimento logarítmico nos tratamentos com diferentes concentrações do herbicida Boral (esq.) e Heat (dir.)

Por ter sido realizada em condição exploratória, as diluições utilizadas foram exacerbadas (< 25) ou insuficientes (> 300) para a maioria dos tratamentos. Entretanto, esses resultados demonstram que nos tratamentos que apresentaram UFC > 300 tem mais células viáveis que em tratamentos que apresentaram UFC < 25, logo, em certas condições as linhagens crescem mais que em outros.
Na figura 1 observa-se que a linhagem 9.6 tem o controle com mais UFC no final do crescimento, o tratamento de 1x o herbicida Boral também apresenta o mesmo padrão. Já o tratamento que contém 40x o herbicida já citado os valores estão abaixo de 25 UFC, sugerindo que o crescimento da bactéria é afetado pelo herbicida diminuindo a quantidade de células viáveis. A linhagem 9.9 apresentou valores abaixo de 25 UFC em todos os tratamentos e horários, sugerindo que mesmo com as diferentes doses dos herbicidas o crescimento se mantém igual ao controle. A linhagem 10.3 apresenta um valor alto no início do controle, decaindo com o tempo, já com 1x o herbicida as UFC se mantém ao longo do tempo, e em 40x o herbicida

ocorre um pico maior no horário médio do crescimento, mostrando que ela atinge seu pico de crescimento no meio da fase logarítmica.
Na figura 1, podemos observar que a linhagem 9.6 apresenta o crescimento no controle com grande quantidade de UFC no início (> 300), médio no horário do meio da fase logarítmica e decaindo no final. Em 1x e 40x o crescimento é inesperado, apresentando altos valores no horário final do crescimento, sugerindo que a linhagem não é afetada pelo herbicida. As diluições para a linhagem 9.9 foi ineficaz em todos os tratamentos, não possibilitando a contagem das UFC. O mesmo ocorre com a 10.3, que apresenta apenas o valor final para o tratamento de 40x, sendo que este é alto, uma vez que as outras condições tiveram UFC < 25.
A linhagem 9.6 apresentou altas taxas de viabilidade nas fases finais de crescimento e, em ambos os herbicidas, excluindo o tratamento com 40X Boral, provavelmente por ser uma concentração muito tóxica para esta linhagem. Estes dados sugerem que esta linhagem pode ter um padrão de degradação destes xenobióticos que irá diminuir suas concentrações tóxicas a partir da fase final do crescimento logarítmico. Estes dados também sugerem a utilização dos herbicidas como fontes de nutrientes para esta linhagem. A linhagem 10.3 pode ter um comportamento semelhante em termos de degradação, mas é possível que necessite de maiores quantidades de fonte de carbono advindo dos herbicidas, uma vez que em concentrações de 40X a viabilidade se apresentou com maiores taxas. Finalmente, a linhagem 9.9 pareceu indiferente aos herbicidas em termos de viabilidade, o que sugere que esta linhagem apenas possua mecanismos de tolerância aos herbicidas.
As taxas de viabilidade aqui discutidas poderão e deverão ser determinadas em contagens em placas a partir de diferentes diluições a fim de serem os modelos de estudo dos próximos projetos. Além disso, essas linhagens poderão agora ser testadas para degradação e estresse oxidativo para avaliar estas hipóteses.

**Conclusões**

As linhagens estudadas, principalmente a 9.6 e 10.3, são candidatas a testes de degradação e avaliação de rotas de metabolização dos herbicidas Boral e Heat, e, portanto, de avaliação de potencial biotecnológico para biorremediação.

**Agradecimentos**

Ao CNPq pela bolsa concedida.

**Referências**

DOBRZANSKI, T. et al. *Bacillus megaterium* strains derived from water and soil exhibit differential responses to the herbicide mesotrione. **PLoS One**, n. 13, p. 1–24, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE PROCESSAMENTO DE EMBALAGENS VAZIAS. O processo de destinação de embalagens vazias de defensivos agrícolas, n. 2000, p. 1–6, 2007.

LERCH, T. Z. et al. Biofilm vs. Planktonic Lifestyle: Consequences for Pesticide 2, 4-D Metabolism by *Cupriavidus necator* JMP134. **Front. Microbiol**, n. 8, p. 1–11, 2017.

PILEGGI, M. et al. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. **Chemosphere**, n.86**,** p. 1127–1132, 2012.