

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E DA RIZOSFERA EM ÁREA DE MATA ATLÂNTICA CONTAMINADA COM METAIS PESADOS

Almir José Ferreira¹; Welington Luiz de Araújo²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: almirzezito@hotmail.com¹
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail welingtonluiz@umc.br²

Área do Conhecimento: Microbiologia/Genética de Microrganismos

Palavras-chave: Endófitos; Rizosfera; Metais Pesados; Diversidade

INTRODUÇÃO

A área de estudo é parte da Mata Atlântica e apresenta inconformidades nos níveis de Ferro, Manganês, Chumbo, Cádmio, Cobre e Zinco. Nesta área há grande representatividade das plantas *Tecoma stans* (Bignoniaceae) conhecida popularmente com Ipê Mirim e *Blechnum brasiliense* (samambaia), subarborescente, pertencente à família Blechnaceae. Estas plantas podem abrigar microrganismos endofíticos, estes são caracterizados como todos aqueles que colonizam o interior da planta hospedeira sem causar danos ou formar estruturas externas visíveis (Azevedo & Araújo, 2007). Nesta relação simbiótica os endófitos recebem abrigo e em troca podem produzir metabólitos úteis à planta hospedeira, promovendo muitas vezes uma melhora nutricional da planta mesmo em solos carentes, além da redução da incidência de patógenos (VOLKSCH *et al.*, 1992). Entretanto, estes microrganismos são dependentes da planta e dessa forma, estresses ambientais como estes ocorridos na área podem alterar a composição microbiana das plantas, visto que as alterações no pH, baixos teores de nutrientes, bem como disponibilidade de água podem alterar a frequência e diversidade destes microrganismos endofíticos (BASHAN & HOLGUIN, 1997).

OBJETIVOS

Avaliar a diversidade da comunidade de bactérias endofíticas e da rizosfera das plantas *Tecoma stans* e *Blechnum brasiliense* em área de Mata Atlântica contaminada com metais pesados.

METODOLOGIA

O local de estudo é o Parque Nagib Najar (W46°13'3" S23°31'21"), estabelecido na cidade de Mogi das Cruzes, SP ao sul da Serra do Itapety e às margens do Rio Tietê, a área possui 484.408 m². De acordo com análises físico-químicas do solo da área estudada, foram escolhidos 4 locais (1, 2, 5 e 6) de coleta. Em cada ponto foram coletadas amostradas três plantas das duas espécies (*Tecoma stans* e *Blechnum brasiliense*) avaliadas. Foram realizadas duas coletas, uma em abril de 2007 e outra em maio de 2008, nas quais foram amostrados caule de plantas jovens e sadias, com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. O material foi identificado e transportado para o Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana (NIB/UMC), onde as amostras vegetais foram lavadas cuidadosamente em água corrente e desinfetadas superficialmente por meio do tratamento em álcool 70% (1min), hipoclorito de sódio 2% (3 min.), álcool 70 % (30 seg.) e dois enxagues em água esterilizada. Após desinfecção superficial, 1,2 g de tecido vegetal do caule foi macerado em 3 mL de tampão PBS e agitado vigorosamente. Alíquotas apropriadas foram semeadas sobre

meio TSB 5% suplementado com fungicida Benomyl ($50 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), e incubadas a 28°C por 2 a 15 dias. Após crescimento bacteriano, as colônias foram contadas e a densidade bacteriana foi estimada em UFC.g tecido vegetal⁻¹. Isolados representativos da diversidade bacteriana foram coletados de forma aleatória, identificados morfológicamente por meio da coloração, tamanho e taxa de crescimento e posteriormente armazenados em frascos contendo meio TSB 5%. Sua caracterização molecular foi realizada através de seqüenciamento, para isso foi realizada extração de DNA, onde as bactérias foram crescidas em 5 mL de meio TSB 5% por 24 horas a 150 rpm. Dois mL da cultura bacteriana foram centrifugados e ressuspensado em 500 μL tampão TE (1M de Tris-HCl pH 8 e 10M de EDTA). Posteriormente, foram adicionados 30 μL de SDS 10% e pérolas de vidro (0,1mm, Sigma), e as células foram rompidas por meio de agitação em homogeneizador de células (mini *bead beater*, Biospect). Em seguida, foi adicionado 1 volume de fenol, homogeneizado por inversão e centrifugado a 14000 X g por 5min. O sobrenadante foi coletado, acrescido um volume de clorofane (fenol 1:1 Clorofórmio) e centrifugado novamente a 14000 X g por 5min. O sobrenadante foi novamente coletado e adicionado um volume de clorofórmio e novamente centrifugado a 14000 X g por 5min. Por fim, a fase aquosa foi coletada, adicionado 0,6 volumes de isopropanol e 20 μL de cloreto de sódio 5M e incubado a temperatura ambiente por 5min. A suspensão foi centrifugada a 14000 X g por 5min, o sobrenadante descartado, e o DNA lavado com etanol 70% gelado e secado a 37°C por 40 minutos. A qualidade e quantidade do DNA foram avaliadas em gel de agarose (1%) e o material teve seu gene 16S rRNA amplificado por meio de PCR, na qual foram utilizados os primers R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e P027F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'), os quais são específicos para o domínio Bactéria. A PCR foi realizada em um volume final de 50 μL contendo tampão da enzima 1 X, 3,75 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 μM de cada primer, 0,1U/ μL de Taq DNA Polimerase. A reação da amplificação foi realizada em termociclador, programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a $62,5^\circ\text{C}$ por 1 minuto e extensão de primers 72°C por 1 minuto, seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, 5 μL da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1%) e seu produto purificado e seqüenciado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional (NIB/UMC). As seqüências obtidas foram analisadas comparativamente via BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra a base de dados do GenBank, que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor *score* de alinhamentos locais entre a seqüência submetida e o banco de dados. Dessa forma foram consideradas as seqüências que apresentaram os maiores valores de similaridade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A densidade bacteriana variou de 1,89 a 4,03 (Log₁₀ UFC.g caule⁻¹) nas duas espécies de planta, sendo maior em *Blechnum brasiliense*, chegando em média até 4,03 (Log₁₀ UFC.g caule⁻¹). Já em *Tecoma stans* a densidade bacteriana chegou a 2,61 (Log₁₀ UFC.g caule⁻¹). Por meio da análise pelo método de comparação entre duas amostras independentes (JACQUES, 2003) nas plantas amostradas, foi observado que houve diferença significativa (P=0.0006) entre as densidades bacterianas de *Tecoma stans* e *Blechnum brasiliense*. Desta forma, os resultados corroboram a hipótese na qual a densidade bacteriana varia de uma espécie de planta hospedeira para outra. A pequena variação sofrida na densidade bacteriana endofítica de *T. stans* e *B. brasiliense* entre os locais amostrados pode ser devido ao fato de *T. stans* ser arbórea, enquanto ser *B. brasiliense* arbustiva. Isto pode indicar que a comunidade de microrganismos presente

nessa planta sofre pouco efeito devido à contaminação do solo. No entanto, possíveis diferenças nos níveis de contaminação nos locais amostrados podem mascarar os resultados do tratamento estatístico dos efeitos de contaminantes sobre a comunidade de determinado local. Desta forma, fez-se necessário tratamento estatístico visando também amostrar a diferenças na densidade de acordo com o local e planta hospedeira. O tratamento revelou uma menor densidade no local 2 tanto em *B. brasiliense* quanto *T. stans*, indicando possível interferência dos contaminantes sobre a comunidade. A análise correlativa linear simples, realizada por meio do programa Bioestat 4.0 por meio do coeficiente de correlação de Pearson (JACQUES, 2003) revelou que apesar de aparentemente alguns teores de metais se relacionarem tanto inversamente proporcionais quanto proporcionalmente à densidade da comunidade bacteriana, estatisticamente é improvável. Nos locais onde foram observados teores maiores de ferro e zinco, tanto em *T. stans* como em *B. brasiliense*, a densidade bacteriana também foi maior (figura 1). Entretanto, após a análise correlativa não foi confirmada tal tendência ($P= 0.47$ para Fe e $P=0.13$ para Zn). Os teores de cobre ($P=0.73$) e manganês ($P=0.97$), apesar de aparentar tendência contrária, a da densidade de bactérias nas plantas em seus respectivos locais não foi confirmada estatisticamente. Os níveis de cálcio, assim como outros metais também não apresentaram relação direta à densidade bacteriana.

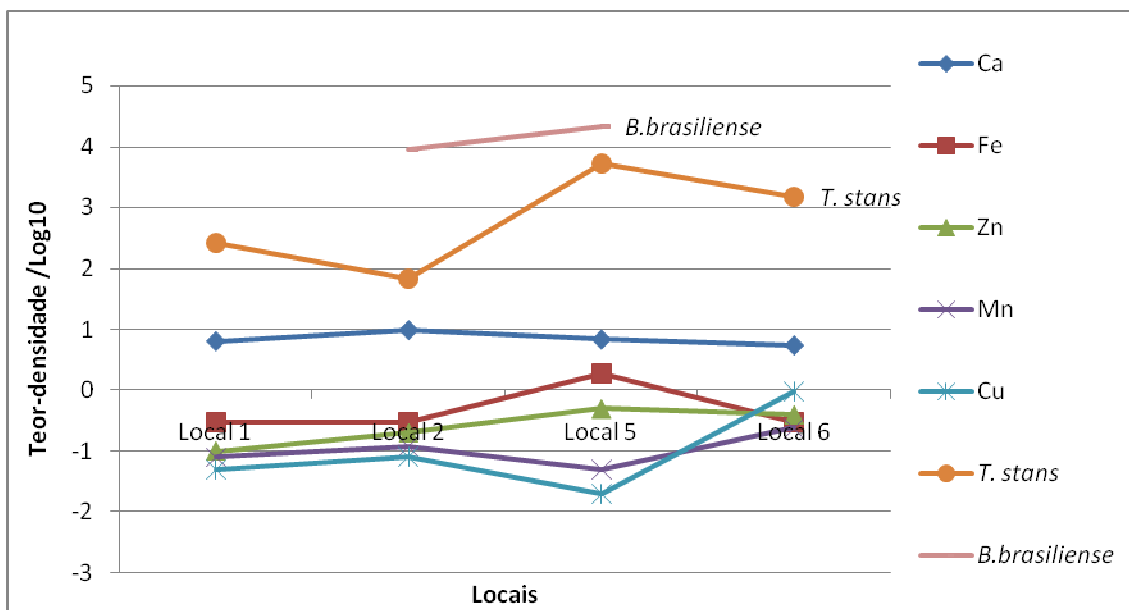


Figura 1. Correlação não confirmada ($P>0,05$) entre os teores de metais biodisponíveis de Ca, Fe, Zn, Mn e Cu com *B. brasiliense* e *T. stans* nos respectivos locais.

Foi observado que as comunidades endofíticas amostrada são compostas por 26 gêneros bacterianos, sendo os mais frequentes *Methylobacterium*, *Actinobacterium*, *Agrobacterium*, *Geodermatophilus*, *Angulomicrobium*, *Massiliatimonae*, *Enterobacter*, *Pandoraea*, *Mycobacterium*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Hymenobacter*, *Aquabacterium*, *Curtobacterium*, dentre outros, dos quais *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Bacillus* foram os mais frequentes. Alguns gêneros, tais como *Angulomicrobium*, *Massiliatimonae*, *Pandoraea*, *Hymenobacter* e *Aquabacterium*, observados neste trabalho não foram relatados anteriormente como endófitos de outras plantas.

CONCLUSÕES

Apesar dos níveis de metais pesados não aparentarem correlação direta com as diferenças na densidade bacteriana, ainda não é possível afirmar que a comunidade bacteriana não foi afetada, visto que até o momento somente foram relacionados dados da comunidade presente na parte aérea da planta, uma vez que, as bactérias presentes na rizosfera podem apresentar uma interação maior com a contaminação de metais do solo. (VOSS & THOMAS 1998). Análises da rizosfera por PCR-DGGE estão sendo realizadas, e associadas à análise estatística multivariada permitirão um maior entendimento sobre a interação bactéria-planta. A densidade fisiológica desta comunidade também pode contribuir, permitindo inferir os efeitos da contaminação do solo sobre a capacidade de regeneração vegetal da área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. . Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli, B.N.; Deshmukh, S.K. (Eds.) **Fungi: Multifaceted Microbes**, Anamaya Publishers, New Delhi, India, 189-207, 2007.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *AZOSPIRILLUM*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v. 43 p. 103-121, 1997.

JACQUES, S. C. **Bioestatística Princípios e Aplicações**. Ed. Artmed, 1ed. p 68-77. 2003.

VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. IDENTIFICATION and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. **Microbial Ecology**, v. 24, p 305-311, 1992.

VOSS, M.; THOMAS, R.W.S.P. Redução da absorção de cobre e manganês em solução por trigo infectado com *Pseudomonas sp.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.5, p.755-760, 1998.