

# DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOOCIADA AO MANGUE

Flávia Mendes da Cunha Holanda<sup>1</sup>; Welington Luiz Araújo<sup>2</sup>

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: flavinhamch@gmail.com<sup>1</sup>  
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: welingtonluiz@umc.br<sup>2</sup>

**Área do conhecimento: Genética molecular e de microrganismos**

**Palavras-chave: Manguezais; Sequenciamento; 16S RNAr**

## INTRODUÇÃO

O manguezal é um ambiente que resulta da junção gradual da água do mar e dos rios, caracterizado por uma água salobra, onde vivem espécies que toleram essa condição salina (BARNES & RUPPERT, 1996). Desta forma, tem uma relevância na economia, pois proporciona um hábitat para peixes e caranguejos muito importantes comercialmente, pois proporcionam a subsistência da comunidade pesqueira que vive em seu entorno. Além disso, este ecossistema tem uma importância significativa na fixação da vegetação no solo, impedindo assim, a erosão e ao mesmo tempo estabilizando a costa; as raízes do mangue também funcionam como filtros na retenção de sedimentos e constitui importante banco genético para a recuperação de áreas degradadas (AZEVEDO & ARAÚJO, 2007).

Nesse hábitat as plantas podem interagir com microrganismos, os quais podem ser bactéria ou fungos. Entre estes microrganismos, encontram-se aqueles denominados de endófitos, os quais colonizam os tecidos saudáveis das plantas, em algum ciclo de sua vida, sem lhes causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis (AZEVEDO & ARAÚJO, 2007). Os endófitos diferem dos epífitos que vivem na superfície das plantas, e dos fitopatógenos, que causam doenças às plantas (SOUZA *et al.*, 2004).

A interação planta/endófito pode ser mutualísticas, neutras ou antagônicas. Nas interações mutualísticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que pode conferir benefícios para a planta hospedeira como tolerância a metais pesados, aumento da resistência à seca, redução de herbivoria, resistência sistêmica contra patógenos e aumento do crescimento vegetal (PEREIRA, 1996 *apud* SOUZA *et al.*, 2004).

## OBJETIVOS

Este projeto de pesquisa faz parte de um projeto financiado pela FAPESP junto ao programa Biota, e por esse motivo tem como objetivo avaliar: (1) a diversidade bacteriana endofítica, por meio de caracterização molecular, associada à propágulos de *Rhizophora mangle*, presente em Cananéia (Ilha do Cardoso) e em Bertioga, Estado de São Paulo; (2) o efeito da contaminação do mangue por petróleo sobre a comunidade endofítica; (3) a capacidade de bactérias endofíticas de *R. mangle* em produzir agentes antimicrobianos contra *Fusarium oxysporum*.

## METODOLOGIA

### Material vegetal e bactérias produtoras de agentes antimicrobianos

As bactérias endofíticas foram isoladas do caule e raiz de propágulos de *R. mangle* coletados em duas regiões do estado de São Paulo, sendo uma a região de Bertioga

(contaminada com petróleo) e outra na Ilha do Cardoso (Cananéia, SP), no período de verão e inverno. Para tanto foram utilizados segmentos com até um centímetro de diâmetro sem lesões.

A capacidade de bactérias endofíticas em produzir agentes antimicrobianos contra *F. oxysporum* (isolado de *Saccharum*. sp.) foi determinada pelo método de pareamento. Os isolados bacterianos foram semeados juntamente com o fungo em meio Batata Dextrose Agar (BDA; Merck KGaA, Germany). A zona de inibição foi mensurada após 7 dias em incubação a 28°C.

#### **Isolamento de Bactérias endofíticas**

Para o isolamento de bactérias endofíticas, o tecido vegetal foi desinfetado superficialmente por meio de uma série de lavagens: etanol 70% por 1 min, imersão de hipoclorito de sódio 2% por 3 min, etanol 70% por 30 segundos e dois enxágües em água esterilizada (ARAÚJO *et al.*, 2001).

Alíquotas de água utilizada na última lavagem foram semeadas em meio TSB (Tryptone Soy Broth) 5% para avaliar a eficiência da desinfecção superficial. Após a desinfecção superficial, o tecido vegetal foi fragmentado em tampão PBS (5 mL de PBS para cada 1 g de tecido vegetal) em tubo de 5 mL e agitado por 2 min. Posteriormente, 100 µL da suspensão foram diluídas em tampão PBS e semeado sobre meio TSB 5% suplementados com benomyl (50 µg. mL<sup>-1</sup>). Em seguida, as culturas foram incubadas a 28°C por até 30 dias, quando foi observado o crescimento de bactérias e realizada a contagem para determinação da densidade bacteriana.

Após o crescimento, as colônias representativas da diversidade bacteriana foram coletadas aleatoriamente, purificadas por meio de estrias de esgotamento e estocadas em frasco contendo meio TSB 5% inclinado.

#### **Identificação de bactérias endofíticas pelo sequenciamento do 16S rDNA**

As bactérias endofíticas foram identificadas por meio do sequenciamento do 16S rDNA. Para isso a seqüência do gene 16S rDNA foi amplificada por PCR com os primers P027 (5'- GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3') e R1387 (5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG - 3'), em reações com volume final de 50µl contendo 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 µM de cada primer, 3,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 U de Taq DNA Polimerase.

O produto do PCR do 16S rDNA foi purificado com o Kit GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech) e enviados para ser seqüenciado no Laboratório de Genômica Estrutural da Universidade de Mogi das Cruzes (NIB, Mogi das Cruzes, SP). Para a identificação dos isolados bacterianos, as seqüências 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 mais altos valores de similaridade.

A árvore filogenética foi construída com base na região do 16S rDNA obtida no sequenciamento. Para o alinhamento, edição e construção das árvores foi utilizado o programa MEGA versão 3.1. O agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Neighbor-Joining* (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Isolamento de microrganismos**

A partir da metodologia descrita acima, foi possível isolar microrganismos endofíticos do caule e da raiz dos 35 propágulos de *R. mangle*. Em relação ao isolamento das bactérias endofíticas, foi observado que a média da densidade bacteriana do caule por isolamento variou entre 10,36 a 39,6 x 10<sup>3</sup> UFC.g caule<sup>-1</sup>, enquanto a densidade

bacteriana da raiz por isolamento variou entre 8,4 a 58,0  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>. Ambas, com grande variação na densidade, porém, os resultados da raiz sugerem que a densidade bacteriana apresenta uma tendência de aumentar no sentido 1<2<3<4<5. Além disso, fatores ambientais como pluviosidade temperatura e luminosidade podem alterar a densidade de bactérias associadas à planta hospedeira. Neste contexto, foi observado para solos agriculturáveis que a densidade bacteriana de raízes pode sofrer variação decorrente da umidade, visto que este órgão está em contato direto com o solo assim como sua alteração, como acidez, umidade, dentre outros (BASHAN & HOLGUIN, 1997).

#### **Caracterização molecular das bactérias endofíticas**

Da comunidade isolada, 200 isolados foram coletados aleatoriamente para identificação e caracterização. Até o momento, o 16S rDNA de 31 isolados (sendo 16 isolados das raízes e 12 isolados do caule) Por meio da análise via BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra a base de dados do GenBank, foi observado que a comunidade bacteriana associada aos propágulos de *Rhizophora mangle* é composta pelos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Mangroveibacter*, *Methylobacterium*, *Pandoraea*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Tsukamurella*, os quais pertencem aos filos bacterianos, Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria.

#### **Bactérias produtoras de agentes antimicrobianos**

A análise da frequência de bactérias produtoras de antimicrobianos foi realizada com 100 isolados, distribuídos entre os cinco isolamentos realizados no período de verão e inverno, para verificar a capacidade destes isolados em inibir o crescimento do fungo patogênico *F. oxysporum*. Destes 100 isolados, apenas dois (2%) pertencentes ao 1º isolamento na região contaminada por petróleo em Bertioga foram capazes de inibir o crescimento do fungo patogênico *F. oxysporum*.

### **CONCLUSÃO**

Os resultados do isolamento permitem concluir que as bactérias colonizam endofiticamente o caule e as raízes de propágulos de *R. mangle*, e que a densidade microbiana pode ser dependente das condições ambientais como temperatura e pluviosidade. Além disso, 2% dos isolados testados conseguiram inibir o fungo patogênico *F. oxysporum*, mostrando que a frequência de bactérias com esta habilidade é reduzida na comunidade bacteriana endofítica de *R. mangle*.

Em relação aos resultados obtidos com a caracterização molecular das bactérias, foi observado que a comunidade bacteriana de *R. mangle* é composta por *Bacillus*, *Enterobacter*, *Mangroveibacter*, *Methylobacterium*, *Pandoraea*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Tsukamurella*, mostrando que a diversidade bacteriana associada aos caule e raízes desta planta deve ser alta, visto que 10 gêneros bacterianos foram observados em apenas 31 isolados avaliados até o momento.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. **Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks.** Canadian Journal of Microbiology, 47: 229-236, 2001

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: enviromental and physiological advances (1990-1996).** *Canadian Journal of Microbiology*, 43:103-121, 1997.

BARNES, R.D.; RUPPERT; E.E. **Zoologia dos invertebrados-** 6ª edição. p. 3 – 4. São Paulo: Roca, 1996

SOUZA, A.L.S.; SOUZA, A.D.L.; FILHO, S.A.; PINHEIRO, M.L.B.; SARGUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantastóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*.** *Acta Amaz*, 34: (2). Manaus, 2004.