

DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO MANGUE

Flávia Mendes da Cunha Holanda¹; Wellington Luiz Araújo²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: flavinhamch@gmail.com¹
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wellingtonluiz@umc.br²

Área de 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). Desse modo, o manguezal, torna-se um elo de ligação entre os ambientes marinhos, terrestres e de água doce, caracterizando-se por uma constante conquista de novas áreas pelo acúmulo de grandes massas de sedimentos e detritos trazidos pelos rios e pelo mar. O manguezal tem uma relevância na economia, pois proporciona um hábitat para peixes e caranguejos muito importantes comercialmente, permitindo a subsistência da comunidade de pescadores que vive em seu entorno (HILL, 2001; OTINTO *et al.*, 2003). Além disso, este ecossistema tem uma importância significativa na manutenção do solo, visto que a vegetação fixa o sedimento, impedindo, assim, a erosão e ao mesmo tempo estabiliza a costa; as raízes do mangue funcionam como filtros na retenção de sedimentos e constitui importante banco genético para a recuperação de áreas degradadas.

Os manguezais são constituídos por diferentes espécies vegetais como: *Rhizophora mangle* (mangue vermelho); *Laguncularia racemosa* (mangue branco); *Avicennia sp.* (mangue preto, canoé); *Conocarpus erectus* (mangue de botão) (OTINTO *et al.*, 2003). O mangue vermelho é um dos mais importantes e dominantes dentre as espécies nas áreas litorâneas (DUKE & ALLEN, 2006).

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 e 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 endófito-planta pode ser mutualísticas, neutras ou antagônicas. Nas interações mutualísticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem 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 (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES & DIAS, 1996; PEREIRA, 1996 *apud* SOUZA *et al.*, 2004; CLAY, 1988; SAIKKONEN *et al.*, 1998 MALINOWSKI & BELESKY, 1999; CLAY & SCHARDL, 2002 *apud* ARNOLD, 2003).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar a comunidade bacteriana endofítica de caule e raiz de propágulos de *Rhizophora mangle* e estudar o

efeito da época de amostragem e contaminação por petróleo sobre a diversidade bacteriana nesta planta hospedeira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

Bactérias endofíticas foram isolados do caule e raiz de 35 propágulos de *R. mangle* coletados em duas áreas do estado de São Paulo, sendo uma na região de Bertioga (contaminada com petróleo) nos meses de fevereiro (isolamento 1) e setembro (isolamento 3) de 2007 e outra na Ilha do Cardoso (Cananéia,SP) nos meses de maio (isolamento 2) e outubro (isolamento 4) de 2007. Somente propágulos sem sintomas aparentes de doenças (lesões e necroses) foram coletados e levados ao laboratório em no máximo 24 horas.

Isolamento de microrganismos

Foram realizados 4 isolamentos de bactérias endofíticas. Para isso, o tecido vegetal foi desinfectado 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). Aliquotas de água utilizada na última lavagem foram semeadas em meio TSB (Tryptone Soy Broth) 5% sólido para avaliar a eficiência da desinfecção superficial.

Após a desinfecção superficial, 1 g de tecido vegetal foi fragmentado em 5 mL de tampão PBS e agitado por 2 min. Posteriormente, a suspensão foi diluída em tampão PBS e aliquotas de 100 µL foram semeadas sobre meio TSB 5% suplementados com benomyl (50 µg.mL⁻¹). Em seguida, as culturas foram incubadas a 28°C por até 30 dias, quando foi observado o crescimento de bactérias e realizado a contagem para determinação da densidade bacteriana (UFC.g⁻¹)

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. Alternativamente, os isolados bacterianos foram estocados em glicerol 20% a -20°C.

Caracterização molecular

As bactérias foram crescidas em meio TSB 5% por 24 horas a 28°C. Após crescimento 2 mL da cultura foi centrifugada por 5 minutos, a 1200 G, para obtenção de um precipitado. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com Mili-Q estéril e centrifugadas por 5 minutos, a 1200 G. As células resultantes foram ressuspendidas em 200 µL de água Mili-Q estéril e 100 µg de sílica foram adicionadas e a suspensão agitada em homogeneizador de células (Bead Better) por um minuto na rotação máxima (4200 bpm). Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 5 min e 1 µL do sobrenadante foi utilizado na reação de PCR, para a amplificação do 16S rDNA. Para isso, o 16S rDNA foi amplificado utilizando os *primers* universais para o domínio bactéria R1387 (CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG) e P027F (GAGAGTTTGATCTGGCTCAG). As condições de amplificação para um volume final de 25 µL foram desnaturaçãõ inicial de 94°C por 7 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. As amostras amplificadas foram purificadas por meio do método de PEG e sequenciadas (*ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Perkin Elmer Applied Biosystems) com o primer R1387, em seqüenciador automático no Laboratório de Genômica (NIB/UMC). Para a identificação dos isolados bacterianos, as seqüências

foram analisadas comparativamente via BLAST (<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

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 10,26 a 39,61 x 10³ UFC.g caule⁻¹, enquanto a densidade bacteriana da raiz por isolamento variou entre 8,36 a 58,02 x 10³ UFC.g⁻¹. 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 quando comparado os 4 isolamentos, mostrando que fatores ambientais como sazonalidade podem alterar a densidade de bactérias associadas à planta hospedeira de forma mais significativa que contaminação e local de amostragem. 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; BALDANI *et al.*, 1999).

Caracterização molecular das bactérias endofíticas

Da comunidade isolada, 200 isolados foram coletados aleatoriamente para identificação e caracterização. Até o momento, o 16S rDNA de 17 isolados (sendo 10 isolados das raízes e 7 isolados do caule) foi sequenciado. 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*, *Pandoraea*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Tsukamurella* e *Xanthomonas*, os quais pertencem aos filos bacterianos, Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. Até o presente momento não foi possível estabelecer correlação entre a diversidade amostrada e a época e local de coleta.

CONCLUSÃO

Os resultados do isolamento permitem concluir que existe um efeito da época do ano sobre a densidade da comunidade bacteriana endofítica. Além disso, pode ser observado que a comunidade bacteriana endofítica de *R. mangle* apresenta uma diversidade alta, visto que somente 17 isolados foram sequenciados até o momento, mas 9 gêneros já foram observados, entre eles *Bacillus*, *Enterobacter*, *Mangroveibacter*, *Pandoraea*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Tsukamurella* e *Xanthomonas*.

AGRADECIMENTOS

Este projeto está sendo financiado pela FAPESP (Programa BIOTA/FAPESP). Também agradecemos ao programa PIBIC/CNPq/UMC pela bolsa concedida à F.M.C. Holanda.

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.

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

CPTEC. **Precipitação de chuvas no Brasil**. Disponível em: http://www.cptec.inpe.br/clima/monit/monitor_brasil.shtml. Acesso em: 01 dezembro 2007, 14:00.

DUKE, N.C.; ALLE, J.A. ***Rhizophora mangle*, *R. samoensis*, *R. racemosa*, *R. x harrisonii*** . [S.I.]: Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. (Atlantic-East Pacific red mangrove). 2006.

HILL,K.. ***Rhizophora mangle* (red mangrove)**. [S.I.]: Smithsonian Marine Station. Julho,2001. Disponível em: www.sms.si.edu/IRLSpec/Rhizop_mangle.htm. Acesso em: 16 abril 2007, 10: 00.

OTINTO, A.; ACYOLI, A.C.; GONDIM, D.O.; BASTO, E.R.; ESPINDULA, J.; SILAVA, M.M.; LINS, V.B.. **O ecossistema manguezal**. [S.I.]: Gerenciamento costeiro de Pernambuco. Janeiro, 2003. Disponível em: www.vivimarc.sites.uol.com.br/manguezal2.htm. Acesso em: 16 maio 2007, 15: 51.

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.