

CONFECÇÃO DE BIBLIOTECA DE TDNA DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE *Ricinus communis* DE ÁREA IMPACTADA POR METAL PESADO.

Jamile Brazão Lima Silva¹ ; Elisa Esposito² ; João Ronaldo Tavares de Vasconcellos Neto³ ; Luiz Henrique Machado Oliveira⁴ ; Felipe Ferreira da Silva⁵

¹ Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: silvajbl1986@gmail.com ;

² Orientadora, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), e-mail: eesposito@unifesp.com ;

³ Co-orientador, Program de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jrtvasconcellosneto@gmail.com ;

⁴ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: henrique.uefs@hotmail.com ;

⁵ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: felipefsdev@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: solo rizosférico, bactéria, metal pesado

INTRODUÇÃO

Atualmente, considera-se que a diversidade e a atividade microbiana do solo servem de indicativo de sua qualidade, por exercer influência no funcionamento do sistema solo-planta, especialmente nos ecossistemas naturais em que a ciclagem de Carbono e de nutrientes e a fertilidade do solo dependem inteiramente dos processos microbianos (Siqueira et al., 1994). Processos como mineralização de materiais orgânicos, amonificação, fixação biológica de nitrogênio, nitrificação, dentre outros, podem ser afetados diretamente pela contaminação com metais ou, indiretamente, pelos efeitos tóxicos desses metais sobre as plantas, causando decréscimo na quantidade de substratos liberados na região rizosférica.

Para Tate (1985), o sucesso da recuperação dessas áreas depende do desenvolvimento da comunidade microbiana do solo, que pode atuar na sua remediação por meio de processos de imobilização, mobilização e transformação de metais por reações de precipitação extracelular, acumulação intracelular, reações de oxidação e redução, metilação e demetilação, ligação extracelular e complexação (Brierley, 1991).

Desta forma o presente trabalho tem o intuito de identificar os componentes da comunidade microbianada rizosférica de *Ricinus communis* com o emprego de ferramentas de biotecnológicas.

METODOLOGIA

Coleta: A área foi escolhida, de modo aleatório, e então foi demarcada obtendo uma área final de 1 m². Nesta área foram feitas escavações com profundidade de 30 cm e , então, recolhido o solo em dez (10) pontos diferentes para no final serem peneirados e formarem uma só amostra.

Diluição seriada: O solo rizosférico foi transferido para Erlenmayer de 250 mL numa proporção de 5 g de solo para 50 mL de tampão PBS junto com pérolas de vidro, a solução foi deixada por 1 hora em agitação de 150 rpm em um agitador orbital (*Provocell-Shaking micro incubator-ESCO*). Logo após esse período as amostras foram submetidas a uma diluição seriada em água estéril de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³.

Plaqueamento e isolamento: Foi retirada uma alíquota de 100 µL da última diluição e semeada em placas de *Petri* contendo o meio TSA (*Tryptone Soya Agar, Oxoid*) e incubadas à temperatura correspondente do solo no momento da coleta. Após o crescimento, que

ocorre entre 24 a 96 horas, foi feito o isolamento das bactérias, através de repiques para novas placas e destas para tubos de 15 mL para minimizar a contaminação.

Preservação: As linhagens isoladas foram preservadas em criotubos estéreis de 1,5 mL contendo água deionizada e autoclavada, sendo armazenadas em temperatura ambiente.

Extração de DNA: Houve ajuste do protocolo Doyle & Doyle, 1987. As bactérias foram reativadas em meio TY, em tubos de 1,5 mL mantidas sob agitação de 180 rpm a 28° C overnight (até 12 horas). Após esse período de reativação, os tubos contendo as bactérias são centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, padrão de velocidade e tempo que se repetirá em todas as centrifugações, então seu conteúdo é descartado sendo observado a formação de um *pellet*. É adicionado ao tubo 1 mL de água ultra-pura autoclavada seguido do uso do vortex (placa agitadora) seguido de centrifugação. Após a centrifugação a água é descartada do tubo, sendo adicionado 650 microlitros de CTAB (pré-aquecido a 65 graus Celsius por no mínimo 40 minutos), os tubos são colocados em banho-maria por 1 hora. O reagente adicionado a seguir é 650 microlitros de Cloroformio-Álcool isoamílico na proporção 24:1 e em seguida colocados na placa agitadora por 10 minutos e após esse período mais uma centrifugação. Após a centrifugação faz-se a aspiração do sobrenadante, elegido um padrão de 500 microlitros em todos os tubos, que é transferido para outro tubo com a mesma capacidade e identificação, tendo 500 microlitros de Isopropanol gelado adicionado em seguida e estocado a - 20° Celsius por no mínimo 40 minutos ou overnight. Após esse período de estocagem o tubo é centrifugado tendo formação de um *pellet* e tem todo o conteúdo restante descartado. A etapa de limpeza faz-se com a adição de 1 mL de Etanol 70 % seguida do uso do vortex e mais uma centrifugação. Os tubos tem o sobrenadante descartado e são colocados em posição vertical na estufa a 50° Celsius por no mínimo 20 minutos ou até não se perceber o cheiro de álcool. O DNA é ressuscitado com a adição de 55 microlitros de água ultra-pura autoclavada e colocado em banho maria por 30 minutos a 35 graus Celsius e em seguida estocados a - 20° C. Preparação para 1L de meioTY: 5g de Triptona, 3g de Extrato de levedura e 0,9 g de Cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O)

Amplificação: A amplificação foi feita da região 16S r DNA através dos primers F 1387 e R387. O volume para uma reação foi de 25 microlitros contendo: 2,5 microlitros de Tampão TAQ (10X), 1,5 microlitros de cloreto de magnésio (50mM), 0,5 microlitros de DNTPs (10mM), 0,5 microlitros do Primer R 387, 0,5 microlitros do Primer F 1387, 0,2 microlitros de TAQ (5U/ microlitro), 18,3 microlitros de água ultra ultra-pura e 1 microlitro de DNA. Os produtos do PCR foram analisados através do gel de eletroforese a 1% de agarose e fotodocumentados.

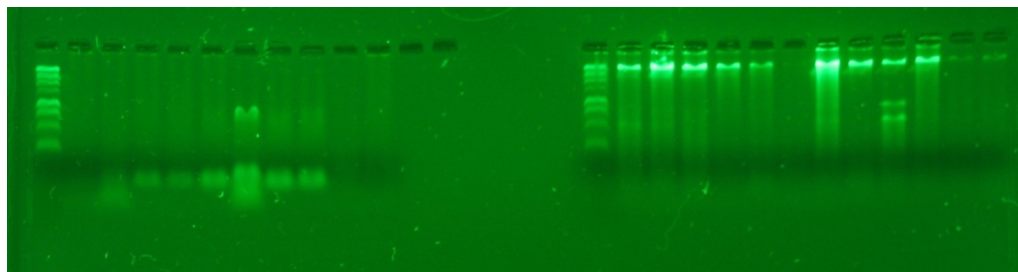
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Obteve-se cerca de 600 bactérias isoladas a partir da diluição seriada e do plaqueamento, as quais tiveram o DNA extraído e mensurado em quantidade de nanograma/microlitro e relações de pureza da amostra pela quantidade de composto fenólicos e protéicos analisadas através de espectrofotometria. (Figura 1.)

Amostra	Concentração de ácido nucléico em ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
1	22.1	0.441	0.21	2.1	4.07
2	24.3	0.485	0.23	2.14	3.68
3	28.4	0.567	0.29	1.97	1.85
4	180.9	3.617	1.76	2.06	2.14
5	191.2	3.824	1.88	2.03	1.91
6	186.6	3.732	1.82	2.05	2.04
7	15.7	0.314	0.14	2.18	3.81
8	16.6	0.331	0.15	2.26	3.09
9	17.2	0.344	0.16	2.16	2.75
10	55.9	1.118	0.54	2.07	2.34
11	57.2	1.143	0.54	2.13	2.13
12	59.2	1.184	0.58	2.03	2.11
13	2.7	0.054	0.01	6.96	-1.6
14	2.2	0.044	0	11.95	-1.38
15	3	0.061	0.02	4.05	-2.14
16	15.5	0.309	0.14	2.14	1.35
17	15.8	0.316	0.18	1.8	1.29
18	15.8	0.316	0.16	1.93	1.3
19	52	1.041	0.49	2.13	2.3
20	54	1.08	0.51	2.1	2.16
21	49.8	0.996	0.47	2.1	2.72
22	11.6	0.231	0.1	2.4	3.54
23	11.3	0.226	0.1	2.37	3.67
24	12	0.24	0.1	2.32	3.54
25	-0.8	-0.015	0	-4.86	0.3
26	5.8	0.116	0.1	1.22	0.56
27	5.7	0.113	0.09	1.33	0.59
28	63.5	1.27	0.66	1.91	1.57

(Figura 1. Quantificações do NanoDrop 2000)

O DNA extraído foi amplificado e o resultado da PCR foi submetido a eletroferese em gel de agarose a 1% e analisado posteriormente através de fotodocumentação(figura 2).



(Figura 2. Observação do produto da PCR em gel de agarose a 1% sob luz ultravioleta)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grande número de isolados não necessariamente implica em grande diversidade do solo, mas deixa claro o seu potencial exploratório na área da fitorremediação através de ferramentas biotecnológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, J.A.S.A., Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da poluição por metais pesados: o caso da Plumbum em Santo Amaro da Purificação-BA. 2003. 227 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mineral) – Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, São Paulo. 2003.

MOREIRA, I.T.A., PAIXÃO, C.M, ARAÚJO DOS ANJOS, J.A.S. E SARNO, L.N. Resultados preliminares no desenvolvimento de cultivares da mamona na fitorremediação de solo contaminado por metais pesados 2o Congresso Nacional da Mamona. 1-6, Aracajú,SE. 2006.

ALLOWAY B. J.. The origins of heavy metals in soils. In: ALLOWAY, B.J. (Ed.). Heavy metals in soils. New York : J. Wiley, p.29-39, 1995.

BRIERLEY, C. L. Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. Geomicrobiol. J., 8:201-233, 1991.

BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in soil pollution by heavy metals. Biol. Fertil. Soils, 19:269-279, 1995.

CHANDLER, K.; BROOKES, P.C.(1993) Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. Soil Biology & Biochemistry 25, 1231–1239.

FLIEßBACH, A.; MARTENS, R. & REBER, H.H. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. Soil Biol. Biochem., 26:1201-1205, 1994

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. de S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.. Microorganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. EMBRAPA-SP, Brasília-DF, 142p, 1994.

TATE, R.L. Microorganisms, ecosystem disturbance and soil-formation processes. In: TATE, R.L. & KLEIN, D.A., eds. Soil reclamation processes. New York, Marcel Dekker, p.1-33, 1985.