

## **Isolamento de bactérias da Região Amazônica, como modelo para a recuperação de fosfato**

Gama, A.M<sup>1</sup>, Silva, M.S<sup>2</sup>, Moraes, A.B<sup>2</sup>, Carvalho, N.O<sup>2</sup>, Nonato, L.S<sup>2</sup>, Spira, B<sup>3</sup>, Mota, A.J<sup>2</sup>, Yamane, T<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Amazonas UEA, Manaus-AM, <sup>2</sup> Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus-AM), <sup>3</sup> - Universidade de São Paulo - USP, São Paulo-SP.

E-mail: auri\_matos@yahoo.com.br, ssmarcelo1@hotmail.com, tetsuo@usp.br,  
adolfo.mot@gmail.com, [adriane\\_abm@hotmail.com](mailto:adriane_abm@hotmail.com), nanicarvalhoss@gmail.com,  
member@linkedin.com, beny@usp.br,

### **Resumo**

O fósforo é um elemento essencial para a vida de todos os seres vivos, o que tornaria a vida inviável em sua eventual escassez. Seu principal uso está na forma de fertilizantes para a agricultura, devido à pobreza dos solos desse nutriente. Por ser um elemento finito e insubstituível, sua exploração constante, tem levado a depleção e escassez de suas reservas naturais. Os micro-organismos desempenham um papel fundamental no processo de reciclagem do fósforo, visto que, necessitam incorporar este elemento do meio ambiente, na forma de íon fosfato, além de, no processo de decomposição, reciclar o fosfato orgânico disponibilizando-o para as plantas na forma inorgânica, fechando assim o ciclo do fósforo. Em vista desse papel, a finalidade deste estudo é buscar bactérias capazes de realizar uma biorremediação e a reciclagem de fosfato do ambiente. Possibilitando uma melhor compreensão dos mecanismos e da genética subjacente à captação de fosfato. As colônias foram selecionadas morfológicamente pela fenotipagem e isoladas pela técnica de esgotamento de alça em estrias. Após sua purificação, foram preservadas em solução de caldo rico contendo 20% glicerol e estocadas a -20 °C. A hipótese a ser testada é que nesses isolados possam existir um sistema eficiente de captação e assimilação de fosfato.

**Palavras chaves:** Rio Negro, Rio Solimões, fósforo, bactérias.

### **Introdução**

O fósforo é um elemento químico obtido a partir de um mineral “finito e insubstituível” e essencial para a vida. Menos de 1% do total de fósforo existente no planeta está na forma disponível para as plantas, sendo assim, o seu principal uso é na forma de

fertilizantes. Assim sendo, o cenário é de extração contínua das reservas naturais para atender a demanda da agricultura no mundo todo (LOBATO, 1982). As colheitas sucessivas retiram o fosfato do solo, além de outros nutrientes, e a consequência imediata é que com o crescimento populacional, a taxa de depleção de reservas de fósforo já está em ritmo acelerado. Portanto, o risco de esgotamento das reservas naturais é real, e já há algumas décadas uma possível crise do fósforo vem sendo discutida (ABELSON, 1999).

Visto que todos os seres vivos, inclusive os fagos e vírus, carregam material genético (DNA/RNA) com fósforo no esqueleto de suas moléculas, uma eventual escassez desse nutriente tornaria a vida inviável, pois não há nenhum substituto conhecido para este elemento (Saenger, 1984; Machado e Nome, 1999).

Na natureza, as plantas e animais perecem e os micro-organismos degradam moléculas complexas ao nível de estruturas químicas simples que são então reutilizadas para o crescimento de outras plantas e animais, constituindo um ciclo fechado e contínuo. Se esse ciclo se mantivesse de forma contínua, o risco de uma crise real seria mínimo, entretanto, parte do fósforo que vai para o solo, acaba sendo levado para rios e destes para o mar, se deposita no fundo oceânico de profundezas abissais o que inviabiliza sua extração e aumenta muito o tempo para a reciclagem natural (Wanner, 1996).

Dessa forma, entendemos que é importante estudar medidas viáveis para retornar o fósforo para o ciclo e concebendo que os micro-organismos exercem um papel fundamental na reciclagem de fósforo, é *conditio sine qua non* que se estude a diversidade microbiana de rios da região Amazônica, principalmente aqueles onde existe uma quantidade relativa inferior desse nutriente, quando comparada com outros ambientes. A hipótese a ser testada é que nesses possa existir um sistema eficiente de captação e assimilação de fosfato (Morohoshi *et al.* 2002; Almeida e Spira, 2014).

### **Material e Métodos**

Como não existem precedentes para esse tipo de abordagem, na região amazônica, usamos como modelo de estudo os dois rios de nossa região, Rio Aracá e Rio Solimões. É sabido que esses dois macroambientes são bastante diferentes em várias propriedades físico-químicas e nutricionais, o que de certa forma irá colaborar para se testar a hipótese de

mecanismos de seleção agindo sobre um sistema mais eficiente para a recuperação do fosfato pelos micro-organismos.

Foram coletadas amostras de água de dois locais do estado do Amazonas, (1) Rio Solimões nas proximidades do Município de Manacapuru (três pontos de coleta); e (2) Rio Aracá, um importante afluente do Rio Negro (quatro pontos de coletas: na Serra do Aracá, na o encontro entre o rio Aracá e o Rio Pretinho, numa posição intermediária entre a nascente e o Rio Negro, e por fim, no encontro com o Rio Negro). As indicações das localidades são relativas porque não foi possível a utilização de GPS para o georeferenciamento.

As amostras do Rio Solimões foram coletadas em garrafas estéreis de 1 L e transportada em caixas térmicas com gelo, até o laboratório. Para cada amostra, diluições sucessivas com 0,9% solução salina (0.9 g NaCl para 100 mL de água destilada, esterilizada a 121 °C por 20 min) foram realizadas até se obter a diluição de  $10^{-5}$ . 50 µL de cada diluição foram semeados nos meios de cultura, TSA-antibiótico (Agar Triptona de Soja + 50 µg.mL fluconazol,), LB-antibiótico (Agar Lisine-broth + 50 µg.mLfluconazol) e CT-antibiótico (Cetrimide Ágar + 50 µg.mLfluconazol) e incubadas a 35 °C durante 24-48 h. Para as amostras do Rio Negro foram feitos diferenciações com pH (5.0, 6.0 e 7.0) e temperaturas (18, 28 e 35 °C ) e incubadas durante 24-48 h. Após o crescimento das colônias, estas foram selecionadas morfológicamente pela fenotipagem e isoladas pela técnica de esgotamento de alça em estrias. Após sua purificação, foram preservadas em solução de caldo rico contendo 20% glicerol e estocadas a -20 °C.

## Resultados

Foram selecionados morfológicamente 151 isolados do Rio Solimões e 100 isolados para o Rio Negro, conforme a tabela 1. O meio CT não foi semeado para as águas do Rio Negro, pois no teste anterior (Rio Solimões) esse não foi seletivo para *Pseudomonas* sp. que era a intenção inicial utilizando este meio de cultura.

Tabela 1- Bactérias isoladas

	Local
--	-------

Meios de cultura	Rio Solimões			Rio Negro	
	LB	TSA	CT	LB	TSA
Número de isolados	69	21	61	38	62

Com o intuito de favorecer espécies que pudessem estar sendo inibidas por competição ou substâncias antagônicas provindas de outras espécies presentes na amostra, variou-se a condição de cultivo quanto a temperatura e pH para a amostragem do Rio Negro. O número absoluto de isolados estão contido na tabela 2.

Tabela 2 - Isolados do Rio Negro por diferentes temperatura e pH

Meio LB			Meio TSA		
Temperatura ° C	pH	Número de Isolados	Temperatura ° C	pH	Número de Isolados
18	5,0	7	18	5,0	7
	6,0	112		6,0	61
	7,0	107		7,0	185
28	5,0	10	28	5,0	207
	6,0	120		6,0	215
	7,0	113		7,0	219
35	5,0	222	35	5,0	222
	6,0	248		6,0	228
	7,0	136		7,0	225

Devido à grande dificuldade em identificar micro-organismos, inicialmente foi feita a identificação pela metodologia molecular e a partir dos resultados, escolher alguns isolados de cada espécie e realizar os testes morfológicos e bioquímicos. Pelo aspecto macroscópico das colônias como tamanho médio, margens, elevação, consistência, brilho, coloração, entre outros, foi possível agrupar os isolados, destacando-se maior diversidade de cores entre os isolados do rio Aracá com colônias brancas, amarelas, vermelhas, roxas, rósea e bege. Ainda, 7 isolados apresentam características morfológicas semelhantes as de *Crhomobacterium violaceum*, uma proteobacteria que vive no solo e nos rios das regiões tropicais, inclusive no Rio Negro. Os isolados do Rio Solimões são de predominância com colônias brancas e beges.

## Discussão

Os resultados apresentados são preliminares, provenientes de coleta única o que inviabiliza um tratamento estatístico. Entretanto, a diversidade podem indicar uma diversidade genética, e reforçar a expectativa de encontrar sistemas eficientes na captação do fosfato. O Rio Negro é o modelo de estudo, pois suas águas são levemente ácidas e de baixa condutividade elétrica, resultado da pobreza em elementos alcalinos, alcalinos terrosos e nutrientes, como o fósforo livre, nitrito e nitrato. A concentração de Pi não ultrapassa 30  $\mu\text{M}$  (PROJETO BRASIL DAS ÁGUAS, 2003), logo, as bactérias adaptadas a este ambiente devem ter um sistema de incorporação de Pi muito eficiente, digno de ser investigado. A escolha de coletar também em seu tributário deve se que outros trabalhos realizados no laboratório utilizaram este rio como modelo de estudo.

Entre os integrantes da microbiota do Rio Negro, destaca-se *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria de vida livre, encontrada em solos e rios de ecossistemas tropicais e subtropicais (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). Identificam-se no genoma de *C. violaceum*, os principais genes de um sistema conhecido de captação de fosfato, o *regulon* PHO (*phoB*, *phoR*, operon *pst* e *phoA*). O *regulon* é caracterizado por um grupo de genes e operons expressos em resposta a um mesmo fator ou estímulo e controlados por uma mesma proteína regulatória. Em relação ao fosfato, os genes são induzidos em condições de limitação de Pi (concentração de Pi externo < 4  $\mu\text{M}$ ), e são regulados pelo sistema de dois componentes PhoR/PhoB (SPIRA, 2010). Entretanto, a funcionalidade dos genes e a sua regulação em *C. violaceum* ainda não foram estudados. Considerando a finalidade de estudar sistemas eficientes de reciclagem do fósforo e a existência do *regulon* PHO no genoma de *C. violaceum*, os isolados com as características sugestivas para essa espécie seguirão para estudos subsequentes sobre o funcionamento desse *regulon* e a eficiência da captação e assimilação de fósforo.

## Conclusões

Dentre os diversos isolados, sete podem apresentar possível potencial para estudos subsequentes sobre o sistema de captação de fósforo, tendo em visto que estes isolados

apresentam características morfológicas sugestivas para *C. violaceum* uma bactéria com o *regulon* PHO em seu genoma.

Futuros estudos devem ser realizados para visando a identificação dos isolados, e verificar a existência do *regulon* PHO em seus genomas, assim como avaliar a cinética de incorporação de fósforo, bem como o mecanismo de funcionamento do *regulon* PHO.

### Referências

- Abelson PH (1999) A potential phosphate crisis. *Science*, Washington, DC 283:2015.
- Almeida LG, Ortiz JH, Schneider, RP.; Spira, B (2015) *phoU* Inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* enhances accumulation of ppGpp and polyphosphate. *Appl Environ Microbiol*, n. 9, v. 81, p. 3006-3015.
- Brazilian National Genome Project consortium (2003) The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, Washington, DC, 100:11660-11655.
- Lobato AJ (1982) Adubação fosfatada em solos da Região Centro-Oeste. In: OLIVEIRA, A J. *Adubação Fosfatada no Brasil*. Brasília: Ed. EMBRAPA-DID, p. 201-289.
- Machado VG, Nome F (1999) Energy-Rich Phosphate Compounds. *Quim. Nova* , 22, 351.
- Morohoshi T. et al (2002) Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. Strain PC6803. *Applied an environmental Microbiology*, Am. Soc. Microbiol, 68:4107.
- Projeto Petrobras Ambiental. Projeto Brasil das Águas, 2003-2004. Disponível em: [www.brasildasaguas.com.br](http://www.brasildasaguas.com.br)
- Saenger W (1984) Principles of Nucleic Acid Structure, Springer: New York.
- Spira B, Ferenci T (2008) Alkaline phosphatase as a reporter of  $s^S$  levels and *rpoS* polymorphisms in different *E. coli* strain. *Arch. Microbial*, Heidelberg, 189:43-47.
- Spira B. et al (2010) Alternative promoters in the *pst* operon of *E. coli*. *Mol. Genetics and Genomics*, Sweden, 284:489-498.
- Wanner BL (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon in: *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Biology*, 1:1357-1381.