

Bactérias endofíticas com potencial de degradar hidrocarbonetos, isoladas a partir de macrófitas aquáticas, coletadas em áreas portuárias de Manaus - AM.

Marinho, M. P. S. ¹, Souza, R. D. N. S. ¹, Santos, J.C. ², Lima, J. M. S. ², Pereira, J. O. ²,
Batista, I. H. ¹, Ferreira, F. S. ¹

¹Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. ² Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Manaus. E-mail: priscila_marinho18@hotmail.com

Resumo

O problema da poluição ambiental tem caráter mundial. As áreas portuárias são locais acometidos diariamente com diversos tipos de contaminantes. Nessas áreas encontram-se uma variedade de Macrófitas Aquáticas. Os endofíticos são microrganismos que habitam os tecidos internos de plantas auxiliando em seus processos metabólicos. O presente trabalho consistiu no isolamento de bactérias endofíticas com potencial para degradação de hidrocarbonetos de petróleo a partir de macrófitas aquáticas coletadas em duas áreas portuárias de Manaus- AM. Foram isoladas 142 bactérias, que após purificação foram testadas em ensaio de biodegradabilidade com indicador Redox 2,6 – Diclorofenol Indofenol (DCPIP). As bactérias M111, M136, M113, M91, M87 e M18 apresentaram resultado positivo para o teste de biodegradabilidade, descolorindo o meio em até 48 horas. Pelos resultados positivos obtidos estes micro-organismos merecem mais investigações acerca de seu potencial degradador.

Palavras Chave: Macrófitas aquáticas. Bactérias Endofíticas. Biodegradação.

Introdução

Na Amazônia há uma ampla diversidade de micro-organismos, destacando-se a microbiota endofítica, que habitam tecidos internos das plantas (Ryan et al, 2008). Os micro-organismos desempenham importante papel ambiental, uma vez que podem utilizar contaminantes como fonte de energia, podendo, desempenhar a função de restauração dos padrões ambientais (Melo e Azevedo, 1997). A partir de técnicas de degradação denominada de biorremediação.

Metodologias utilizando bactérias têm revelado o grande potencial desses micro-organismos no processo de descontaminação de áreas poluídas, apresentando um custo relativamente baixo e resultados significativos. (Fu e Viraraghavan, 2001).

De acordo com Souza (2015), ambientes classificados como altamente e moderadamente contaminados estão situados na costa da cidade Manaus. Dessa forma mostra a relação da alta atividade de navegação como fonte direta de contaminação com derivados de petróleo. Nessas áreas portuárias encontram-se uma variedade de macrófitas aquáticas, que são vegetais que habitam desde brejos até ambientes totalmente submersos. Essas plantas constituem-se em uma importante comunidade em ecossistemas aquáticos (Esteves, 1998).

A escolha destes vegetais neste trabalho deve-se a presença destas plantas em ambientes contaminados e poluídos. Este aspecto trouxe o interesse em investigar a relação de micro-organismos endofíticos dessas macrófitas com a capacidade de resistir a esses ambientes.

Nesse sentido, consideram-se as associações entre macrófitas aquáticas e micro-organismos que possam estar contribuindo para a transformação de compostos poluentes em moléculas com menor impacto ao ambiente. Dentro desse contexto, o presente estudo compreende o isolamento de bactérias endofíticas com potencial para degradação de hidrocarbonetos de petróleo, contribuindo para o conhecimento do potencial de degradação por micro-organismos oriundos da biodiversidade amazônica.

Material e Métodos

As amostras foram coletadas em áreas portuárias, cercadas pelo Rio Negro, na cidade de Manaus-AM, onde há um fluxo recorrente de embarcações e conseqüente derrame de derivados do petróleo como óleo diesel. As áreas portuárias de realização das coletas foram: Porto Hidroviário da Manaus Moderna localizado no Bairro Centro e Porto Marina do Davi localizada no Bairro da Ponta Negra.

Foram coletadas folhas, caules e raízes das plantas com aparência sadia, sem sintomas visuais de doenças ou lesões. As espécies coletadas foram a *Eichornea crassipes* (No Porto Hidroviário da Manaus Moderna – Centro) e, *Sauvinia auriculata* e uma macrófita não identificada cujo nome vulgar é Gramínea aquática (Coletada no Porto Marina do Davi – Tarumã).

Após a coleta, as amostras foram colocadas em sacos plásticos e levadas até o laboratório de Biodegradação na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde ocorreu o isolamento dos micro-organismos. O isolamento das bactérias endofíticas foi realizado de

acordo com a metodologia adaptada de Pereira (1993). Inicialmente, foram cortadas com auxílio de uma tesoura, as folhas e as raízes que foram higienizadas com água corrente com auxílio de uma esponja nova e macia e detergente neutro; enxaguadas com água destilada e colocadas para secar em uma bandeja forrada com papel toalha autoclavado.

Em câmara de fluxo laminar as amostras foram submetidas à desinfecção superficial em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 4 minutos, lavado em solução de álcool 70% por 30 segundos para retirar o excesso de cloro da superfície e para retirar todo o restante das soluções, os materiais foram lavados três vezes com água destilada ou bidestilada esterilizada. Como controle da assepsia do material isolado, a água de lavagem foi inoculada em placas de Petri contendo os meios de cultura, com auxílio de uma alça de drigalski.

Após a desinfestação superficial, as folhas foram cortadas em fragmentos de cerca de 0,7 cm, com o auxílio de um furador, e as raízes foram cortadas em fragmentos medindo cerca de 0,1 cm a 0,3 cm, com o auxílio de um bisturi, que foram inoculados em placas de Petri contendo meio BH- Bushell Hass (g/L: sulfato de magnésio: 0,20, cloreto de cálcio: 0,02, fosfato monopotássico: 1,0, fosfato dipotássico: 1,0, nitrato de amônio: 1,0, cloreto férrico: 0,05, ágar: 20,0) com fungicida e petróleo (5mL/L). Foram preparadas duas placas, com o mesmo meio, para cada macrófita, com sementeira de 1 mL da água destilada usada para a desinfecção como controle do isolamento. As placas foram incubadas a 28 °C sendo visualizadas diariamente no período de 24 às 96h. Após o período de crescimento das bactérias, as placas foram então levadas à câmara asséptica para repicagem dos isolados para tubos de ensaio contendo o mesmo meio do isolamento. Esses tubos foram datados e identificados em seguida guardados em recipientes plásticos à temperatura ambiente.

Após o isolamento realizou-se a purificação das bactérias por meio da técnica de esgotamento por estrias. As bactérias foram retiradas dos tubos onde estavam armazenadas, e dispostas em placas contendo meio NA (Nutriente Ágar), em estrias. Após 24 horas foi retirada uma colônia de um ponto isolado da placa, sendo estriada novamente em outro tubo de ensaio contendo NA sólido e em seguida foram acondicionadas na geladeira a 16 °C.

Para a preservação das bactérias purificadas, foi retirada uma alçada da colônia bacteriana, sendo inseridas em tubos tipo *ependorf* específicos para cada bactéria contendo meio NA líquido. Os tubos foram mantidos a 170 rpm a 28°C durante 24 horas. Após esse período, foi retirado 1 mililitro da colônia para ser introduzido em tubos criogênicos contendo água destilada e glicerol a 20%. Após esse processo, os tubos foram acondicionados no congelador a - 5 °C.

Foi verificado se os isolados eram capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo. O teste de biodegradabilidade foi realizado usando a técnica baseada no uso do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (Hanson et al, 1993). O meio para o teste de biodegradabilidade foi preparado com meio BH- Büshnell-Haas. Os pocinhos, das microplacas, contendo o meio BH, foram preenchidos com uma pipeta de precisão, com 200 µL de indofenol e 10 µL de petróleo.

Cada bactéria foi introduzida, com auxílio da alça de platina, em dois pocinhos. A primeira coluna foi utilizada como controle 1 (meio BH + indofenol + petróleo/ sem bactéria) e a segunda como controle 2 (meio BH + indofenol + bactéria/ sem petróleo). As microplacas foram mantidas a $(28 \pm 2 \text{ } ^\circ \text{C})$. A mudança de tonalidade na coloração do meio em cada inóculo foi avaliada após 24 e 48 h, para detecção de atividade biodegradadora. As bactérias que apresentaram resultados positivos foram submetidas à coloração de GRAM e suas características macroscópicas, cor e consistência, foram registradas.

Resultados e Discussão

Foram coletadas para isolamento de endofíticos três macrófitas aquáticas. Dentre essas somente duas foram identificadas a *Eichornea crassipes* e a *Sauvinia auriculata*. A macrófita que não foi identificada foi a Gramínea aquática.

Foram obtidas 142 bactérias endofíticas sendo 82 isolados de *Eichornnia crassipes*, 14 isoaldos de *Salvinia auriculata* e 69isolados da gramínea aquática (Tabela 1).

Tabela 1: Bactérias endofíticas isoladas a partir de *Eichornia crassipes*, *Sauvinia auriculata* e Gramínea aquática.

Origem	Número de fragmentos infectados	Índice de colonização %
<i>Eichornea crassipes</i>		
Folha	18	50,00%
Raiz	14	38,80%
Gramínea aquática		
Folha	9	25,00%
Raiz	8	22,20%
<i>Salvinia auriculata</i>		
Folha	2	5,50%
Raiz	5	13,80%

Os índices de colonização foram, respectivamente para folha e raiz, 50% e 38,8% (*Eichornea sp.*), 5,5% e 13,8% (*Salvinia auriculata*) e 25% e 22,2% (gramínea aquática). A maior quantidade de bactérias endofíticas isoladas foi a partir da espécie *Eichornea crassipes*, sendo que, a parte da planta que mais se obteve isolado foram as folhas apresentando um maior índice de colonização (Tabela 2).

Tabela 2: Número de isolamento de bactérias endofíticas isoladas de *Eichornia crassipes*, *Sauvinia auriculata* e *Gramínea aquática*.

Origem	Parte da planta		Total
	Folha	Raíz	
<i>Eichornea crassipes</i>	41	41	76
Gramínea aquática	30	16	46
<i>Salvinia auriculata</i>	3	11	14
Total	74	68	142

A colonização das bactérias ocorreu nas folhas e nas raízes das plantas resultados esses que corroboram aqueles obtidos por Rosenblueth e Romero (2006) que encontraram bactérias endofíticas em diversos tecidos de plantas. As folhas das macrófitas apresentaram o maior índice de colonização. Estes resultados divergem daqueles encontrados por Martins (2011), pois, na maioria das plantas estudadas, nos tecidos das raízes encontram-se valores mais elevados de endofíticos comparativamente aos tecidos das partes aéreas.

Araújo (2014) isolou 155 bactérias da macrófitas aquática *Eichornia crassipes* sendo que 58 eram de origem endofítica oriunda das folhas, das raízes e das flores da planta em local portuário com resíduo de petróleo e óleo diesel. Batista (2009) isolou 71 bactérias, sendo 29 de origem endofítica, oriundas de folhas, caules, bulbos e raízes da macrófita aquática *Eichornia crassipes* coletadas em local com resíduos de petróleo.

Todos os isolados foram testados para a verificação do potencial de biodegradabilidade de hidrocarbonetos de petróleo. A biodegradabilidade foi observada a partir da mudança da tonalidade do meio azul a incolor (Figura 1).

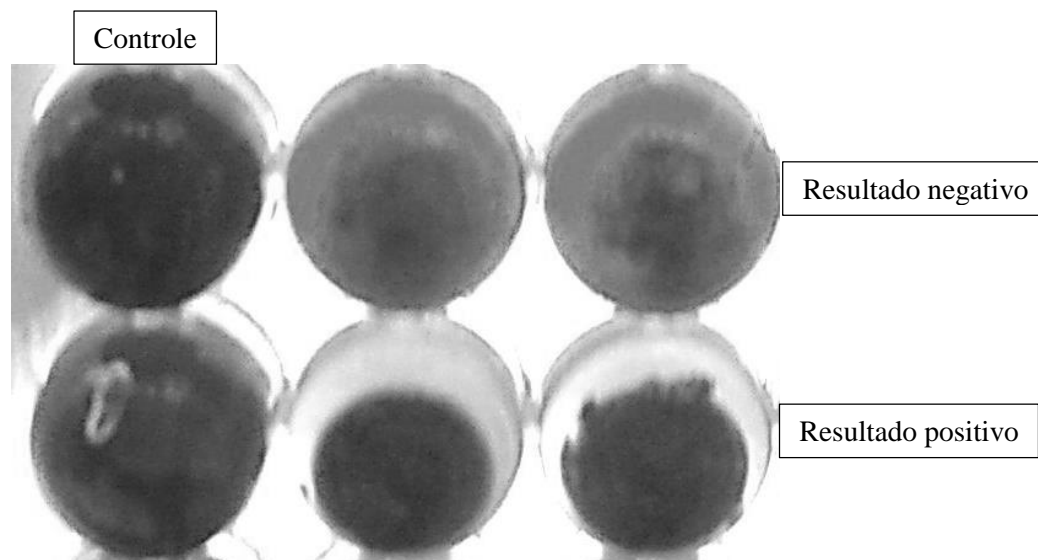


Figura 1: Teste de biodegradabilidade. Bactérias testadas com o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), mostrando o resultado positivo e negativo para o teste, nos tempos de 24 a 48 horas de incubação para confirmação de potenciais degradadores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com a mudança da coloração do azul para o incolor.

Dos 142 isolados, 6 bactérias apresentaram atividade de biodegradabilidade no intervalo de 24 e 48 horas, sendo que no período de 24 horas, três bactérias (M111, M136 e M87) promoveram a descoloração do meio e em 48 horas outras três modificaram a coloração (M113, M91 e M18) (Tabela 3). Dentre as demais bactérias, algumas modificaram a cor do meio em tempos maiores que 48 horas e outras não alteram essa coloração.

Tabela 3: Relação entre a biodegradação realizada pelas bactérias e o tempo.

Isolados (Cepas) / Código *M	Biodegradação / Tempo (horas) *X	
	24h	48h
M 111	X	
M 136	X	
M 113		X
M 91		X
M 18		X
M 87	X	

*X: Indica o resultado em horas da biodegradação.

Esses resultados corroboram com os descritos por Araújo (2014), que em seu estudo, utilizando o método do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), demonstrou que

bactérias provenientes de macrófitas aquáticas de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados possuem a capacidade de utilizar o petróleo como fonte de carbono. As bactérias isoladas em seu estudo apresentaram tempo menor de descoloração demonstrando com isso a possibilidade de selecionar micro-organismos com habilidades para degradar os hidrocarbonetos de petróleo e derivados, a partir desse teste.

Os trabalhos de Peixoto e Vieira (2005) indicam que os testes são eficientes e rápidos para a detecção da capacidade de biodegradação de compostos, especificamente de hidrocarbonetos de petróleo, utilizando o redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para reações de óxido-redução.

Quanto às características macroscópicas e microscópicas das cepas testadas foi observadas que M111 é um bacilo pequeno Gram-negativo, a cor da cultura é creme claro com consistência cremosa; M 136 é um bacilo Gram-positivo, a cor da cultura é creme médio com consistência cremosa; M 87 apresenta forma de coco Gram-positiva, a cor da cultura é amarela com consistência cremosa; M113 bacilo Gram-positivo, a cor da cultura é creme escuro tendendo ao marrom e consistência cremosa e M91 bacilo pequeno Gram-negativo, a cor da cultura é creme médio com consistência cremosa; M18 é um bacilo Gram-negativo, a cor da cultura é creme claro também com consistência cremosa. Estas cepas foram isoladas de folhas e raízes de *Eichornea crassipes* e de Gramínea Aquática (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização morfológica das linhagens de endofíticos que apresentaram potencial biodegradador e enzimático.

Cepas *Código M	Planta Hospedeira	Orgão da planta	Forma das células	Característica da cultura		Gram
				Cor	Consistência	
M 111	<i>Eichornea crassipes</i>	Raíz	Bacilo	Creme claro	Cremosa	-
M 136	<i>Eichornea crassipes</i>	Raíz	Bacilo	Creme médio	Cremosa	+
M 113	Gramínea aquática	Folha	Bacilo	Creme escuro (Tendendo ao marrom)	Cremosa	+
M 91	Gramínea aquática	Folha	Bacilo pequeno	Creme médio	Cremosa	-
M 18	<i>Eichornea crassipes</i>	Raiz	Bacilo pequeno	Creme claro	Cremosa	-
M 87	<i>Eichornea crassipes</i>	Raiz	Coco	Amarelo	Cremosa	+

*Código M = Mayra, 2014.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, o isolamento de endofíticos a partir das macrófitas coletadas pode ser considerado positivo, visto que, foi possível isolar 142 bactérias endofíticas em meio seletivo para degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Destacou-se neste estudo a macrófita *Eichornea crassipes*, de onde foi obtido o maior número de isolados.

O teste de biodegradabilidade utilizando o Indicador Redox 2,6 – indofenol diclorofenol DCPIP realizado, mostrou-se eficaz para a observação da capacidade de biodegradabilidade de bactérias endofíticas. Através dele selecionou-se 6 linhagens de bactérias isoladas com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos em 24 e 48 horas. Estes microrganismos merecem investigações mais detalhadas para confirmar seu poder biodegradador.

Os resultados obtidos podem proporcionar conhecimentos e informações para aperfeiçoar técnicas e desenvolver processos biotecnológicos utilizando os microrganismos oriundos de áreas portuárias de Manaus/AM.

Os estudos demonstram, portanto, a capacidade de micro-organismos da biodiversidade Amazônica em realizar processos de biodegradação, contribuindo para o conhecimento da microbiota Amazônica.

Referências Bibliográficas

Araújo SP (2014). Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na Amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Tese de doutorado (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 158p.

Batista IH (2009). Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: Um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia Crassipes* na Amazônia. Tese de doutorado (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 184p.

Fu Y, Viraraghavan T (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*: v.79, p. 251 – 262.

Hanson KG, Desai DJ, Anjana J (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology techniques*. v. 7 n°10: 745-748.

Esteves FA (1998). Fundamentos de Limnologia. Ed. Interciências/FINEP. Rio de Janeiro, R. J. Cap. 20: p. 316-373.

Martins VCM (2011). Comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Halimione portulacoides*. Departamento de Biologia Universidade de Aveiro

Melo IS, Azevedo JL (1997). Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 440 p.

Peixoto RM, Vieira JDG (2005). Determination of the degrading potential of bacteria isolated from an environment impacted by petroleum and derivatives using 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP). *In: First Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology*, Natal – RN, Brasil.

Pereira JO (1993). Fungos endófitos de hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendishii*. Piracicaba-tese de Doutorado.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan D e Dowling DN (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*. 278: 1-9.

Rosenblueth M and Martinez-Romero E (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact*. 19: 827-837.

Souza HML et al (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Superficial Sediments of the Negro River in the Amazon Region of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 26, No. 7, 1438-1449, 2015. Printed in Brazil.

Wetler-Tonini RMC et al (2011). Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. *Rev. Virtual Quim.*, 2011, 3 (2), 78-87. Data de publicação na Web: 30 de junho de 2011.