

IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DOS GÊNEROS *MICROCOCCUS* E *PANDORAEA* ISOLADAS DA RIZOSFERA DO CAPIM VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*)

João Victor Rego Ferreira¹

Andressa Sbrano da Silva²

Denise Maria Mano Pessoa³

Alexander Machado Cardoso⁴

Resumo

As bactérias associadas a raízes de diferentes plantas exercem um papel fundamental no desenvolvimento vegetal. Em gramíneas, como o capim Vetiver, as bactérias podem promover o crescimento das plantas e auxiliar na produção de óleos essenciais. Neste trabalho, a utilização do meio AMS foi capaz de permitir o crescimento de diferentes bactérias após 48 horas de incubação. Destas, dois gêneros com grande potencial biotecnológico foram isolados do solo aderido a raízes, sendo identificados através de metodologia molecular como sendo *Micrococcus* e *Pandoraea*.

Palavras-chave: Fitorremediação. Microbiota. Óleo essencial.

IDENTIFICATION OF *MICROCOCCUS* AND *PANDORAEA* ISOLATED FROM THE RIZOSPHERE OF VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*)

¹Doutor em Biotecnologia pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, Brasil.

²Doutora em Biotecnologia pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, Brasil.

³Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

⁴Doutor em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

Abstract

The bacteria associated with the roots from different plants play a fundamental role in plant development. In grasses, such as Vetiver grass, bacteria can promote plant growth and assist in producing essential oils. In this work, the use of the AMS medium allowed the growth of different bacteria after 48 hours of incubation. Two genera with great biotechnological potential were isolated from the soil attached to roots, being identified through molecular methodology as being *Micrococcus* and *Pandoraea*.

Keywords: Phytoremediation. Microbiota. Essential oil.

Introdução

O capim Vetiver tem sido utilizado em vários países para diversos fins de proteção ambiental como no controle da erosão, sendo também capaz de recuperar áreas degradadas (BANERJEE *et al.*, 2016). Além disso, as raízes dessa planta produzem um óleo essencial famoso por suas propriedades curativas e relaxantes (LAVANIA, 2003).

A quantidade e composição deste óleo produzido variam de acordo com a comunidade bacteriana associada a suas raízes (DEL GIUDICE *et al.*, 2008) e algumas destas bactérias também podem promover o crescimento das plantas fixando nitrogênio e produzindo hormônios vegetais (MONTEIRO *et al.*, 2011). FITRIANI e colaboradores (2012) descobriram que as bactérias, incluindo os gêneros *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Lysinibacillus* possuem o gene da cetosintase, que está envolvido na produção do óleo de Vetiver. O isolamento e seleção de cepas bacterianas que levem a uma melhor produção deste óleo essencial são fundamentais para a melhoria deste processo. Neste trabalho, foi utilizado o meio de cultivo AMS (Amônia Mineral Sólido) com o intuito de isolar bactérias metanotróficas associadas a rizosfera do capim Vetiver capazes de aprimorar a produção do óleo essencial.

As bactérias metanotróficas são capazes de utilizar o metano, convertendo-o em água e dióxido de carbono. Sendo quimiotróficas, também são capazes de fixar o carbono do dióxido de carbono sob forma de matéria orgânica, produzindo biomassa bacteriana. O processo de oxidação eficiente depende de diferentes fatores, tais como: temperatura, características do solo, físico-químicos e dos microrganismos associados a planta ou ao solo empregado. Esses microrganismos formam um grupo fisiologicamente único e distinto por sua habilidade de poder usar o CH₄ como única fonte de carbono e energia. Desempenham um importante papel no ciclo global do metano, oxigênio e nitrogênio. Além disso, possuem alto potencial para uso em biotecnologia como agentes biodegradadores, biorremediadores e modificadores de moléculas devido à plasticidade de seu metabolismo (OREMLAND e CULBERTSON, 1992; HOLMES *et al.*, 1999).

Materiais e Métodos

Coleta das amostras e triagem das bactérias

Foram coletados 50g de solo aderido a raízes do capim Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*). A amostra de solo foi armazenada em tubos falcons e guardada no freezer a -20°C. Para o isolamento das bactérias foram pesados 0.5g da amostra e diluída a 10⁻¹ em solução salina a 0.85%. As amostras foram incubadas por 50 minutos a 30°C a 150 rpm (rotações por minuto). Posteriormente foi preparada diluição seriada em solução salina 0.85% usando diluições de 10⁻² a 10⁻⁷. De cada diluição de amostra foram plaqueados 200µL em cada placa de petri contendo meio Amônia Mineral Sólido (0,54g KH₂PO₄; 0,7g K₂HPO₄; 1g MgSO₄.7H₂O; 0,5g NH₄Cl; 0,02g CaCl₂.2H₂O; 4mg FeSO₄.7H₂O; 100µg ZnSO₄.7H₂O; 30µg MnCl₂.4H₂O; 300µg H₃BO₃; 200µg CoCl₂.6H₂O; 10µg CuCl₂.2H₂O; 20µg NiCl₂.6H₂O; 60µg NaMoO₄.2H₂O; 10 ml CH₄O;

15g ágar e água para 1 litro, sendo o meio esterilizado por autoclavagem por 20 minutos. Após 7 dias de incubação foram realizadas as contagens de unidades formadoras de colônias por mL. As contagens de colônias (UFC) foram realizadas em todas as placas que apresentaram o número mínimo de 50 e máximo de 250 colônias. O isolamento foi realizado através da seleção por visualização morfológica das colônias com os seguintes aspectos: tamanho, forma, elevação, cor, superfície, densidade e consistência, sendo isolados morfotipos diferentes. A técnica para obtenção de culturas puras foi a de esgotamento. Os isolados obtidos foram conservados em estoque com 10% de DMSO. Para fazer o estoque dos isolados foi realizado o cultivo em meio mineral amônia líquido (sem ágar). Após o inóculo obter crescimento entre 0,5-1,0 de densidade ótica, usando comprimento de onda de 600 nanômetros, foi preparado o estoque com 0,9 mL de inóculo e 0,1 mL de DMSO. Após este processo os isolados foram congelados no freezer a -80°C.

Extração de DNA dos isolados

Após crescimento em meio de cultivo líquido, as células bacterianas foram concentradas na centrífuga (Marca Eppendorf, modelo 5804 R) a 10.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente foi adicionando 500 µL de água ultra-pura estéril e 500 µL de clorofórmio, álcool isoamílico e 200 µL de NaCl. Em seguida a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. Após essa etapa o sobrenadante foi coletado em outro microtubo para adição de 500µL de isopropanol gelado e a amostra foi homogeneizada. A amostra foi colocada no freezer à -20°C por 1 hora. Após esse período, o material foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500µl de etanol 70% para mais uma vez homogeneizar e centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm. Após os 15 minutos o sobrenadante foi descartado e o microtubo seco em temperatura ambiente. O material

foi ressuspendido em 50µL de água ultra-pura estéril, posteriormente foi aliquotado e estocado no freezer à -20°C. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, e a quantificação foi realizada utilizando o NanoDrop (*ThermoFisher Scientific*).

Amplificação e sequenciamento da região 16S rRNA

O DNA total obtido a partir das amostras foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os iniciadores (primers) F926-GC (5'-AACTCAAAGGAATTGACGG-3') e 1378R (5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3'), que geram fragmentos de aproximadamente 452 pb do gene 16S rDNA. A reação foi realizada com o kit de PCR (*Sinapse*) em volume final da reação de 25 µL composto por Tampão de reação com MgCl₂ (1x); 25 mM de dNTPs; 200 nM microlitros de cada iniciador e 5 U/µL de Taq DNA polimerase (*Sinapse*) e 1 µL de DNA bruto (100ng) de cada amostra. A amplificação ocorreu seguindo o programa: 95°C por 1 minuto para realizar a desnaturação do DNA; 95°C por 15 segundos para completar a desnaturação inicial e depois 35 ciclos; 55°C por 15 segundos para realizar o anelamento; 72°C por 30 segundos com 30 ciclos e 72°C por 7 minutos para a extensão final do fragmento. Ao final foi realizado o resfriamento a 4°C. A reação foi realizada utilizando o equipamento Veriti 96 well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*). Após a amplificação os produtos de PCR foram sequenciados utilizando metodologia padrão (Sanger).

Resultados e Discussão

A metanotróficas são bactérias que podem ser encontradas no solo associadas a raízes de diferentes plantas dentre as quais algumas utilizadas na cobertura final de

aterros sanitários como gramíneas (HANSON e HANSON, 1996). A enzima que cataliza a oxidação do metano a metanol é a metano mono-oxigenase (MMO), da qual são conhecidas em sua forma particulada (pMMO), presente na membrana celular das metanotróficas e em forma solúvel citoplasmática (sMMO), encontrada apenas em algumas espécies (DEDYSH *et al.*, 2000).

Os estudos que visam a identificação e caracterização de bactérias metanotróficas incluem os procedimentos clássicos em microbiologia, como enriquecimento e isolamento, observação da morfologia das colônias e das células e testes bioquímicos de crescimento em condições fisiológicas distintas. Além desses meios, são adotadas também técnicas clássicas e avançadas de biologia molecular, independentes de cultivo. Entre elas está a análise filogenética com base nos genes que codificam o 16S rRNA, que está presente em todo o domínio bacterium, e no gene *pmoA*, que codifica uma região conservada da enzima pMMO, e é, portanto, exclusivo de metanotróficas (DEDYSH *et al.*, 2000).

Neste trabalho, não foi observado crescimento bacteriano em 24 horas ao utilizar o meio Amônia Mineral Sólido (AMS). Apenas após 48 horas foi possível observar um crescimento de $4,8 \times 10^4$ UFC/ml e em 168 horas (7 dias) de $7,4 \times 10^4$ UFC/ml. Após esse período, não houve grandes diferenças de crescimento, sendo inclusive as análises prejudicadas em função do crescimento de fungos. Foram selecionadas as colônias bacterianas que apresentavam maiores diferenças morfológicas. Estes isolados foram crescidos em meio de cultivo líquido e posteriormente extraídos os DNAs. Após amplificação por PCR, o gene 16S sequenciado foi comparado com outros genes 16S através da ferramenta BLAST.

As cepas JV1 e JV4 foram identificadas como *Pandoraea* e *Micrococcus*, apresentando 100% de identidade com as sequências depositadas no GenBank. Embora esses gêneros não sejam conhecidos em estudos envolvendo o metabolismo de óleos essenciais e metano, podem representar uma nova família de metanotróficas associadas a plantas.

As bactérias metanotróficas são divididas em três famílias (tipo I, tipo II e tipo III), as do tipo I são as da família das *Methylococcaceae*, sendo de acordo com análises das sequências do 16S rRNA classificadas como sendo *gama*(γ)-*Proteobacterias* (DEUTZMANN *et al.*, 2011). Incluem-se os gêneros: *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum* e *Methylosarcina*. Bactérias deste grupo assimilam o formaldeído produzido na oxidação do metano (via metanol) utilizando a rota da monofosfato ribulose.

Já as metanotróficas do tipo II, são da família das *Methylocystaceae*, sendo classificadas como sendo *alfa*(α)-*Proteobacteria*. Incluem-se os gêneros: *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocella*. e *Methylocapsa*. Tais gêneros, utilizam a rota da serina para a assimilação do formaldeído (HANSON e HANSON, 1996). Por fim as metanotróficas do tipo III são da família das *Verrucomicrobia*. Incluem-se os gêneros *Methylacidiphilum* e *Verrucomicrobium*, que foram recentemente descritos como microrganismos metanotróficos (POL *et al.*, 2007).

Considerações Finais

No presente estudo foi possível concluir que a utilização do meio AMS foi capaz de permitir o crescimento de diferentes bactérias após 48 de incubação. Destas, dois gêneros com grande potencial biotecnológico foram isolados do solo aderido a raízes do capim Vetiver, sendo identificados através de metodologia molecular como sendo *Micrococcus* e *Pandoraea*. Estudos futuros para a caracterização destas cepas permitirão um melhor entendimento do papel desempenhado na planta e aprimorar a produção do óleo essencial de Vetiver.

Agradecimentos

Agradecemos as equipes da UEZO e PUC pelas discussões. Agradecemos também o financiamento das instituições FAPERJ, CAPES e CNPq.

Referências

- BANERJEE, R.; GOSWAMI, P.; PATHAK, K.; MUKHERJEE, A. (2016). **Vetiver grass: an environment clean-up tool for heavy metal contaminated iron ore mine-soil**. Ecological Engineering, 90, 25–34.
- DEL GIUDICE, L.; MASSARDO, D. R.; PONTIERI, P.; BERTEA, C. M.; MOMBELLO, D. *et al.* (2008). **The microbial community of Vetiver root and its involvement into essential oil biogenesis**. Environmental Microbiology, 10, 2824-2841.
- DEDYSH, S. N.; LIESACK, W.; KHMELENINA, V. N.; SUZINA, N. E.; TROTSENKO, Y. A.; *et al.* (2000). **Methylocellapalustris gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. v.50. p.55-969.2000.
- DEUTZMANN, J.S.; SCHINK, B. (2011). **Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake**. Applied and Environmental Microbiology. v.77. p. 4429-4436.
- FITRIANI, A.; ARYANI, A.; YUSUF, H.; PERMATASARI, Y. (2012). **The exploration of ketosynthase gene on endophytic bacterial root of *Vetiveria zizanioides* L.** International Journal of Basic and Applied Sciences, 13, 112–119.
- HANSON, R. S.; HANSON, T. E. **Methanotrophic bacteria**. Microbiological Review, v. 60, p. 439, 1996.
- HOLMES, A. J.; ROSLEV, P.; MCDONALD, I. R.; IVERSEN, N.; HENRIKSEN, K.; MURRELL, J. C. (1999). **Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake**. Applied and Environmental Microbiology. 65, 3312–3318.
- LAVANIA, U.C. **Vetiver Root e Oil and Its Utilization PRVN Tech. Bull. No. 2003/1**. ORDPB, Bangkok, 2003.

MONTEIRO, J. M.; VOLL, R. E.; COELHO, M. R. R.; FONSECA, A.; GOMES NETO, S. C.; SELDIN, L. (2011). **Bacterial communities within the rhizosphere and roots of vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) sampled at different growth stages.** European Journal of Soil Biology, 47(4), 236–242.

OREMLAND, R. S.; CULBERTSON, C. W. (1992). **Importance of methane-oxidizing bacteria in the methane budget as revealed by the use of a specific inhibitor.** Nature. 356 (6368): 421–423.

POL, A.; HEIJMANS, K.; HARHANGI, H. R.; TEDESCO, D.; JETTEN, M. S. M.; DEN CAMP, H. J. M. O. (2007). **Methanotrophy below pH1 by a new Verrucomicrobia species.** Nature. 450. p. 874-878.