

# CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO GÊNERO *BACILLUS* PROVENIENTES DO RIACHO CAVOUÇO – UFPE COMO INDICADOR DA QUALIDADE AMBIENTAL

Cícero José Luíz dos Ramos Almeida<sup>1</sup>; Márcia Vanusa da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: cicerolivre@gmail.com, <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: marciavanusa@yahoo.com.br.

**Sumário:** Diferentes ações vêm sendo realizadas pelo grupo NuBIOMA (Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente da UFPE) em parceria com a Prefeitura da Cidade Universitária (PCU) na tentativa de resgatar a qualidade da água e vida do Riacho Cavouço. Foram investigados isolados gram-positivos provenientes de cinco pontos do riacho Cavouço da UFPE, sendo a diferenciação dos isolados gram-positivos feitos por meio da técnica de coloração em Gram e observações macroscópicas das colônias. Os isolados identificados correspondem aos gêneros *Bacillus* (*Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformis*) e *Staphylococcus* (*Staphylococcus hominis*). A extração do DNA genômico das culturas de *Bacillus* e *Staphylococcus* foi realizada mediante a técnica descrita por Sambrook *et al* (1989) e para caracterização molecular das bactérias foram utilizados iniciadores específicos para a amplificação do gene RNA ribossômico (WEISBURG *et al.*,1991). As amostras amplificadas foram purificadas e sequenciadas em sequenciador automático de DNA ABI 3100. As sequências de DNA analisadas no banco de dados *GenBank* através da página *web* do NCBI, relevou que a amostra do gênero *Staphylococcus* se tratava de uma bactéria do gênero *Exiguobacterium* com similaridade genética 99% comparada com as sequências depositadas previamente no *GenBank*. Dos isolados correspondentes ao gênero *Bacillus*, as amostras de *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformis* sequenciadas confirmaram os resultados obtidos pelos testes bioquímicos, com 99% de similaridade genética com as espécies depositadas previamente no *GenBank*. Os testes bioquímicos foram importantes para identificação, e os testes moleculares para caracterização genética dos isolados do Riacho Cavouço.

**Palavras-chave:** biologia molecular; genética; microbiota.

## INTRODUÇÃO

A maior parte da produção de efluentes domésticos e industriais é despejada em ecossistemas aquáticos de água doce limitando a disponibilidade dos recursos hídricos e comprometendo as relações entre os seres vivos. A decomposição de substâncias orgânicas por micro-organismo reduz o oxigênio presente na água, causando desequilíbrio nas comunidades naturais (MORAIS E JORDÃO, 2002). O riacho Cavouço localizado nas coordenadas 8°2'52.05" latitude Sul e 34°57'10.33" longitude Oeste, possui sua nascente na Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. No trecho que percorre dentro da Universidade, esse riacho recebe um aporte de carga poluidora de resíduos provenientes dos laboratórios de ensino e pesquisa; resíduo hospitalar, além de despejo doméstico oriundos da população circunvizinha. Estudos recentes comprovam o efeito cumulativo desses resíduos provocado por mudanças na dinâmica desse ecossistema, afetando a qualidade da água, a macro e micro fauna e flora existentes (ARAÚJO E OLIVEIRA, 2013). Diferentes ações vêm sendo realizadas pelo grupo NuBIOMA (Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente da UFPE) em parceria com a Prefeitura da Cidade

Universitária (PCU) na tentativa de resgatar a qualidade da água e vida desse riacho. Dentre essas ações destaca-se a Caracterização Fenotípica da Microbiota do Cavouco. Considerando as interações entre os seres vivos e o ambiente, é factível que alterações nas condições normais do meio influenciam diretamente na dinâmica da sobrevivência desses seres em seus respectivos ecossistemas. Sendo assim, a identificação de perfis genotípicos distintos poderá servir como indicativo da suposta exposição desses organismos aos agentes poluidores. Essa ação, em conjunto com outras realizadas pelo grupo NuBioma poderá auxiliar na implantação de um Plano de Gerenciamento de Resíduos, ainda inexistente na instituição. Paralelamente, poderá despertar e incentivar a comunidade acadêmica para a importância dos temas ambientais e socioeconômicos do *Campus*. O trabalho possuiu como objetivo identificar molecularmente isolados do gênero *Bacillus* provenientes do riacho Cavouco-UFPE, através de técnicas como amplificação por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) o gene ribossomal 16S (*16S rDNA*) e analisar o perfil de restrição do gene 16S rDNA amplificado por PCR (ARDRA).

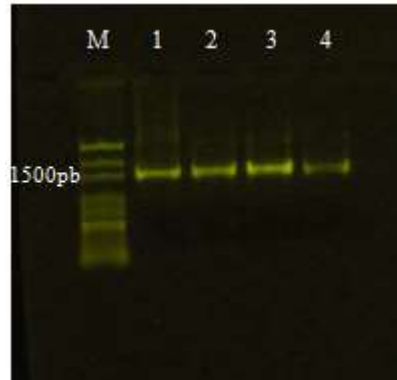
### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram investigados isolados do gênero *Bacillus* provenientes de cinco pontos da UFPE: Nascente (P1), Ponte do Centro de Tecnologia e Geociências – CTG (P2), Ponte da Biblioteca Central – BC (P3), Ponte do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA (P4) e Ponte do Hospital das Clínicas - HC (P5). A diferenciação dos isolados gram-positivos foi previamente realizada por meio da técnica de coloração em Gram. Para identificar essas bactérias observou-se a morfologia das colônias, a presença ou ausência de hemólise em meio ágar sangue e microscopia de colônias novas e antigas. Na sequência foram feitos testes bioquímicos convencionais (KONEMAN et al., 2008) in house e alguns isolados foram confirmados por meio de aparelho automatizado (BD Phoenix™). Os isolados foram mantidos em glicerol -80°C e em Deep Freezer a -80 °C. Foram reativados em meio sólido ágar sangue e incubados em estufa a 37° C por 24 horas para análise molecular. A extração do DNA total dos isolados de *Bacillus* foi realizada mediante a técnica descrita por Sambrook et al (1989). O gene do RNA ribossomal 16S (16S rDNA) foi amplificado utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores : fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al,1991). A purificação dos produtos seguiu o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen) e em seguida sequenciados em sequenciador automático de DNA ABI 3100. Os produtos do gene 16S rDNA amplificados foram clivados com as enzimas de restrição NdeII, HaeIII e StuI a 37°C, em um volume final de 25µL dos produtos amplificados de cada amostra, seguindo o protocolo do fabricante. As reações foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v), em tampão TBE 0,5X, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Em seguida, o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado. Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados e comparados no banco de dados Genbank usando BLASTN, BLASTX e BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### RESULTADOS

Os isolados identificados correspondem aos gêneros *Bacillus* (*Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformis*) e *Staphylococcus* (*Staphylococcus hominis*). Os produtos amplificados do gene 16S rDNA de *S. hominis*, *B. cereus*, *B. pumilus* e *B.licheniformis* apresentaram um peso molecular de aproximadamente 1500 pares de bases, como pode ser visualizado na figura 1. As sequências de DNA analisadas no banco de dados *GenBank* através da página *web* do NCBI, relevou que a amostra do gênero *Staphylococcus* se tratava de uma bactéria do gênero *Exiguobacterium* com similaridade genética 99% comparada com as sequencias depositadas previamente no GenBank. Dos isolados

correspondentes ao gênero *Bacillus*, as amostras de *Bacillus pulimus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformis* sequenciadas confirmaram os resultados obtidos pelos testes bioquímicos, com 99% de similaridade genética de com as espécies depositadas previamente no GenBank.



**Figura 2:** Fragmentos amplificados do gene 16S rDNA de 1= *Bacillus licheniformis*; 2= *Bacillus pumilus*; 3= *Bacillus cereus*; 4= *Staphylococcus hominis*.

## DISCUSSÃO

A caracterização de bactérias realizadas por meio de ensaios bioquímicos tradicionais não é suficiente para serem obtidos resultados fidedignos, é preciso confirmar essa identificação com o auxílio de ferramentas moleculares. Neste estudo, a identificação do isolado referente ao gênero *Staphylococcus* pelos os ensaios bioquímicos foram diferentes dos resultados obtidos molecularmente, que indicou ser o gênero *Exiguobacterium*. Os respectivos gêneros apresentam várias características em comum, como motilidade, catalase e uréase positivas, fosfatase e coagulase negativas, redução ou não de nitrato, produção de ácidos em condições aeróbicas, além de apresentar espécies de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas. As colônias apresentam formas cocóides podendo ser opacas, butirosas ou amarelo-alaranjadas, crescendo a temperatura variante de 20° - 45° C (SCHLEIFER et al, 1979; COLLINS et al, 1983). As características morfológicas semelhantes entre os dois gêneros podem ter contribuído para a caracterização, inicialmente, do isolado bacteriano como *S. hominis* através do aparelho automatizado (BD Phoenix™).

## CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, comprovou-se que os testes bioquímicos foram eficientes na identificação das bactérias gram-positivas isoladas do Riacho Cavouco, e que os testes moleculares foram de grande importância na caracterização e confirmação das espécies dos isolados, mostrando maior sensibilidade e maior especificidade no presente estudo.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à UFPE e a Propesq pelo apoio e incentivo, e as professoras Márcia Vanusa da Silva e Betânia Melo.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M. C.; OLIVEIRA, M. B. M. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. **Rev. Ambient. Água** vol. 8 n. 3 Taubaté - Sep. / Dec. 2013.

ASSIS, C. R. D.; ARAÚJO, M. C. LIMA, A. V. A.; SANTOS, F. M. S.; FERREIRA, A. C. M.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO JR, L. B.; OLIVEIRA, M. B. M. Biomarcadores enzimáticos: uma alternativa para o monitoramento do riacho Cavouco. *No prelo*

AZAMBUJA, A. O.; ALLES, G. C.; FRITZ, L. L.; RECHE, M. H. R.; FIUZA, L. M. Ecologia de *Bacillus* entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 38, 2008.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Rev Saúde Pública**, 2002; 36(3):370-4.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory Manual**, 2ª edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SILVA, L. M. Caracterização molecular e atividade de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) para as brocas da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (FABR.) e *Diatraea flavipennella* (BOX) (Lepidoptera: Crambidae). **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife – PE, 2013.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173:697-703, 1991.