

# ESTUDO MOLECULAR DA DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS PLANCTÔNICOS NO RIO PARAÍBA DO SUL

Elaine Crespim<sup>1</sup>, Francisco G. da Nóbrega<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, modalidade Celular e Molecular, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12244-000- São José dos Campos - SP. E-mail: ecrespim@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Professor orientador – Laboratório de Genética Molecular e Genomas, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos – SP. E-mail: fgdnobre@univap.br

**Resumo** – O presente trabalho visa à identificação de microrganismos planctônicos habitando, em julho de 2003, quatro regiões do rio Paraíba do Sul dentro dos limites de São José dos Campos, São Paulo, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica possui precisão e sensibilidade consideráveis, permitindo inclusive a detecção de organismos de difícil cultivo ou não cultiváveis. As aplicações deste trabalho são tanto ecológicas quanto de interesse sanitário. Obtivemos sucesso na amplificação de genes conservados de bactérias e organismos eucarióticos aquáticos nas amostras coletadas.

**Palavras-chave:** PCR, diversidade, microrganismos.

**Área de conhecimento:** II – Ciências Biológicas.

## Introdução

O rio Paraíba do Sul nasce na confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna. É um rio muito importante na região Sudeste, ocupando uma área drenada de 57000km<sup>2</sup>. Abrange três estados importantes: 36,7% de sua área pertencem ao território do Rio de Janeiro; 39,6% ao território de Minas Gerais e 23,7% ao território de São Paulo. Praticamente no centro de um triângulo composto por estes três estados, localiza-se o Vale do Paraíba, região à qual pertence a cidade São José dos Campos, onde foram realizadas as coletas do presente trabalho (AMORIM, 1998).

Atualmente, muitos rios têm sido vítimas de poluição, com sérias consequências ambientais e sanitárias, não sendo diferente com o rio Paraíba do Sul. É muito importante, portanto, um acompanhamento constante da qualidade da água utilizada para o abastecimento público. Para isso, existem vários métodos e objetos de estudo que podem ser usados de maneira a se complementarem. Um deles, que vem recebendo um crescente destaque, é o estudo dos microrganismos que habitam a água. Como uma pequena quantidade de água pode conter um grande número de microrganismos, que, por sua vez, têm um ciclo de vida relativamente rápido, seu estudo

facilita a compreensão de como os seres vivos do ambiente estão sendo afetados.

Normalmente, o levantamento da diversidade de microrganismos aquáticos é feito com base em sua morfologia, que geralmente é característica do taxon. Porém, sabe-se que muitos microrganismos são bastante semelhantes, mas pertencem a taxons diferentes, o que pode levar a uma classificação incerta. Além do mais, há organismos extremamente pequenos (BALDAUF, 2003), que são de difícil visualização e classificação ao microscópio óptico. Mesmo se analisados com recursos mais potentes, como microscopia eletrônica, a falta de dados a seu respeito dificulta sua classificação. Para ajudar a resolver esse problema, técnicas de Biologia Molecular têm sido empregadas. Esta descoberta, de que a diversidade e filogenia de microrganismos poderia ser amplamente estudada e aprofundada por análise de seqüências de DNA, causou uma revolução na Biologia. O responsável pelos trabalhos seminais neste campo, o Dr. Carl Woese, mostrou que na origem dos procariotos existiam não dois, mas 3 grandes domínios: bactéria, archaea e eucaria (WOESE, 2000). A análise do material genético dos microrganismos tem se mostrado muito eficiente na distinção entre organismos semelhantes. Alguns genes têm regiões conservadas que são específicas de

cada taxon, o que possibilita o uso de “primers” (oligonucleotídeos iniciadores do novo filamento de DNA) complementares a essas regiões para promover a amplificação de parte característica do gene, gerando uma seqüência de nucleotídeos que pode ser comparada à seqüência do mesmo gene de outros organismos, podendo-se observar o grau de similaridade entre elas e, posteriormente, o grau de parentesco entre os organismos comparados. Dessa forma, os organismos recém-descobertos podem ser situados, com uma certa precisão, em taxons já conhecidos, o que facilita seu estudo mais aprofundado, ou pode-se descobrir que pertencem a um novo taxon. Em ambos os casos, os estudos evolutivos, taxonômicos e ecológicos tornam-se bastante implementados (MEDLIN *et al.*, 1988).

O objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detectar a presença de bactérias e microrganismos eucarióticos planctônicos habitando, em julho de 2003, quatro regiões do rio Paraíba do Sul dentro dos limites de São José dos Campos, interior de São Paulo, como etapa inicial de um estudo que visa a correlacionar a abundância destes com as características de cada região de coleta.

## Metodologia

Foram coletadas amostras de água em quatro regiões do Rio Paraíba do Sul, dentro dos limites de São José dos Campos, São Paulo, utilizando-se garrafas plásticas brancas translúcidas de 250mL. A água coletada foi aquela da superfície (ambiente planctônico) e que banhava as raízes de macrófitas, quando presentes, onde há geralmente uma maior concentração de organismos.

As características físico-químicas da água foram medidas com uma multissonda Horiba U-10. A temperatura do ambiente também foi medida, através de termômetro. Os dados registrados encontram-se em Santos, 2002.

**Região 1:** localiza-se no bairro Urbanova, próximo à Universidade do Vale do Paraíba e ao bairro do Pinheirinho, aproximadamente na divisa entre São José dos Campos e Jacareí. Há residências próximas às margens do rio. A falta de saneamento básico resulta no lançamento

dos dejetos diretamente ao rio. A margem oposta ao ponto de coleta sofre assoreamento devido à degradação de sua mata ciliar.

**Região 2:** localiza-se no bairro Santana. O rio Jaguari é seu afluente e um tributário desemboca perto da estação de coleta. Apresenta muitas macrófitas e capituvas.

**Região 3:** localiza-se no bairro Jardim Alto de Santana. É uma área de reflorestamento, com residências aleatórias. Este trecho do rio apresenta muitas macrófitas e capituvas em todo o seu leito.

**Região 4:** localiza-se no bairro Vale dos Pinheiros, conhecido como Vidoca. É um antigo ponto de extração de areia. Atualmente, são lançadas diariamente quantidades excessivas de esgoto sem tratamento. Desde 30/09/2001, estão sendo realizadas obras na galeria pluvial para melhoria do trânsito urbano, o que gerou para esta estação grandes bancos de areia e diminuição na lâmina d'água.

Os passos a seguir foram realizados no Laboratório de Genética Molecular e Genomas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, em São José dos Campos, São Paulo.

Uma gota da água de cada região foi analisada à microscopia óptica e de fluorescência, sem o uso de qualquer tipo de corante, para se ter uma noção da presença de microrganismos nas amostras coletadas.

100mL da água de cada região foram distribuídos entre dois tubos cônicos (Corning) de 50mL. Esses tubos passaram por uma centrifugação a 1000rpm por dez minutos, a 20°C, para os microrganismos mais frágeis e pesados se concentrarem no fundo. Em seguida, o sobrenadante foi transferido a um novo tubo cônico e centrifugado a 6000rpm por 15 minutos, a 10°C, para os microrganismos restantes irem ao fundo. O sobrenadante deste último tubo foi descartado.

O precipitado formado após a primeira centrifugação foi ressuspendido no líquido residual e chamado de “amostra 1”. Já o formado após a segunda centrifugação foi ressuspendido em 300µL de água destilada deionizada e chamado de “amostra 2”.

Todo o volume dos tubos foi transferido a micro tubos limpos (Eppendorf, 1,5mL) e

centrifugado a 14000 rpm por dois minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, que contém as células, passou pelo método de extração e purificação do DNA total (ou seja, o DNA de todos os microrganismos da água), com base nos protocolos relatados por Ogram (1998), como descrito sumariamente a seguir.

Para a extração do DNA, as células foram lisadas através do uso das soluções de lise I (150mM NaCl, 100mM EDTA pH 8, lisozima a 10 mg/mL) e II (100mM NaCl, 500mM Tris HCl pH 8, 10% SDS) e três ciclos de permanência no gelo por cinco minutos, congelamento a -80°C por 30 minutos e descongelamento a 65°C por 20 minutos.

Os tubos foram centrifugados a 8000rpm por dez minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, transferido a um micro tubo limpo. Prosseguiu-se à purificação do DNA, para eliminar os restos celulares, que dificultariam a reação de PCR.

A purificação do DNA consistiu, principalmente, no uso de CTAB e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguida de precipitação com solução de 13% polietileno glicol em 1,6M NaCl, 4M acetato de amônio e etanol 100%. O DNA foi lavado com etanol 70%. O precipitado foi dissolvido em 200µL de TE e o DNA foi considerado pronto para a amplificação por PCR.

Para o PCR, foram utilizados os seguintes iniciadores (“primers”), complementares ao gene do RNA da subunidade ribossômica menor:

- **D88**: iniciador genérico bacteriano, de seqüência:

5' GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG 3' (PASTER *et al.*, 2001)

- **E94**: iniciador genérico bacteriano, de seqüência:

5' GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA 3' (PASTER *et al.*, 2001)

- Iniciador genérico eucariótico **A**, de seqüência:

5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT 3' (Medlin *et al.*, 1988)

- Iniciador genérico eucariótico **B**, de seqüência:

5' TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC 3' (Medlin *et al.*, 1988)

Cada tubo de PCR continha:

- Uma alíquota do DNA extraído e purificado;
- 1x tampão para a enzima Taq polimerase (Invitrogen);
- MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), na concentração 3mM;
- Solução de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), contendo adenina, timina, citosina e guanina (Life Technologies) na mesma proporção. A concentração final dessa solução em cada tubo foi 200µM;
- Um par de iniciadores (bacterianos, na concentração 0,4µM, ou eucarióticos, na concentração 0,1µM);
- 1 unidade da enzima Taq polimerase (Invitrogen);
- Água destilada deionizada, para completar o volume para 25µL.

Os tubos de PCR foram colocados em um termociclador, que executou os seguintes programas:

- **Para PCR com iniciadores genéricos eucarióticos**: Foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos. Em seguida, 30 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos. Após o último ciclo, foi feita uma elongação final a 72°C por 5 minutos.

- **Para PCR com iniciadores genéricos bacterianos**: Foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 61°C por 40 segundos e 72°C por 2 minutos. Ao término do último ciclo, foi feita uma elongação final a 72°C por 5 minutos.

O resultado do PCR foi obtido através de eletroforese das amostras em gel de agarose a 0,8% impregnado com brometo de etídio.

## Resultados e Discussão

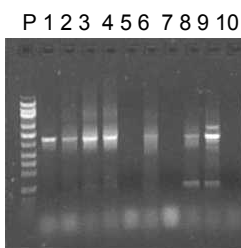
A reação de PCR mostrou-se consideravelmente precisa, tanto na amplificação com os iniciadores eucarióticos (figura 1) como na amplificação com os iniciadores bacterianos (figura 2). Como pode ser observado nas figuras 1 e 2, o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foi de cerca de 1500bp com os iniciadores bacterianos e entre 1600 e 2000pb com os iniciadores eucarióticos, o que corresponde

aos dados descritos na literatura (Paster *et al.*, 2001 e Medlin *et al.*, 1988, respectivamente).

Em cada PCR, foi utilizado pelo menos um controle positivo, ou seja, o DNA de um organismo que pertença ao grupo cuja presença se desejou identificar, para se comprovar a eficiência do programa de PCR utilizado. Foi também utilizado um controle negativo, que consistiu em um tubo contendo os mesmos reagentes de PCR dos outros, mas sem nenhum DNA. O controle negativo é importante para se verificar que não está havendo contaminação, o que poderia gerar um resultado falso.

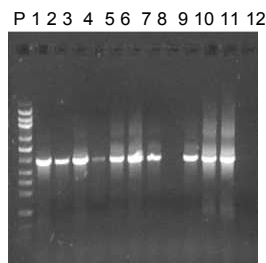
As amostras que não foram efetivamente amplificadas após o PCR passaram por novo PCR, uma vez que a reamplificação pode revelar um fragmento de DNA em amostras muito diluídas. Entretanto, esse não foi o caso, provavelmente devido a uma distribuição desigual entre as amostras 1 e 2 no momento da centrifugação. Tal fato pode indicar a existência de microrganismos diferentes, com pesos diferentes, entre as quatro regiões de coleta. Em todo caso, as fotografias dos géis (figuras 1 e 2) mostram claramente a presença de bactérias e eucariotos no ambiente planctônico de todas as regiões de coleta.

Vale mencionar que apesar da diferença de intensidade entre os fragmentos obtidos no PCR, não foi observada nenhuma diferença significativa e característica entre as amostras 1 (resultante da 1ª centrifugação) e 2 (o sobrenadante, que passou pela 2ª centrifugação), inclusive na análise microscópica.



**Figura 1.** Resultado do PCR com iniciadores eucarióticos. Em **P**, observa-se o padrão de tamanho (Alex), com fragmentos (de cima para baixo): 15000 bp, 7967 bp, 5644 bp, 4408 bp, 2833 bp, 2088 bp, 1575 bp, 1197 bp, 960 bp, 747 bp, 457 bp, 288 bp. 1) DNA do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, como controle positivo do PCR. 2) amostra 1 da 1ª região de coleta.

- 3) amostra 2 da 1ª região de coleta.
- 4) amostra 1 da 2ª região de coleta.
- 5) amostra 2 da 2ª região de coleta.
- 6) amostra 1 da 3ª região de coleta.
- 7) amostra 2 da 3ª região de coleta.
- 8) amostra 1 da 4ª região de coleta.
- 9) amostra 2 da 4ª região de coleta.
- 10) controle negativo de amplificação – não contém DNA.



**Figura 2.** Resultado do PCR com iniciadores bacterianos. Em **P**, observa-se o padrão de tamanho (Alex), com fragmentos (de cima para baixo): 15000 bp, 7967 bp, 5644 bp, 4408 bp, 2833 bp, 2088 bp, 1575 bp, 1197 bp, 960 bp, 747 bp, 457 bp, 288 bp. 1) DNA da bactéria *Staphylococcus aureus*, como controle positivo do PCR. 2) DNA da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, como controle positivo do PCR. 3) DNA da bactéria *Escherichia coli*, como controle positivo do PCR. 4) amostra 1 da 1ª região de coleta. 5) amostra 2 da 1ª região de coleta. 6) amostra 1 da 2ª região de coleta. 7) amostra 2 da 2ª região de coleta. 8) amostra 1 da 3ª região de coleta. 9) amostra 2 da 3ª região de coleta. 10) amostra 1 da 4ª região de coleta. 11) amostra 2 da 4ª região de coleta. 12) controle negativo de amplificação – não contém DNA.

## Referências bibliográficas

AMORIM, Domingos Sávio de. *Qualidade das águas do rio Paraíba do Sul no Vale do Paraíba*. Tese de mestrado apresentada em 1998 na Universidade do Vale do Paraíba.

BALDAUF, S.L. The Deep Roots of Eukaryotes. *SCIENCE*. Vol. 300, p. 1703-1706, 13 de Junho de 2003.

MEDLIN, Linda; Elwood, Hille J.; Stickel, Shawn; Sogin, Mitchell L. The characterization of enzymatically amplified

eukariotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71 (1988), p. 491-499.

OGRAM, Andrew. Isolation of Nucleic Acids from Environmental Samples. Cap. 12. In: Burlage, Robert S.; Atlas, Ronald; Stahl, David; Geesey, Gill; Saylor, Gary. *Techniques in Microbial Ecology*. Oxford, 1998.

PASTER, Bruce J.; Boches, Susan K.; Galvin, Jamie L.; Ericson, Rebecca E.; Lau, Carol N.; Levanos, Valerie A.; Sahasrabudhe, Ashish; Dewhirst, Floyd E. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. *Journal of Bacteriology*, June 2001, p 3770-3783.

SANTOS, S.P. Variação temporal e espacial da comunidade de protozoários planctônicos no rio Paraíba do Sul em São José dos Campos - SP. Trabalho de graduação da Universidade de Mogi das Cruzes. Centro de Ciências Biomédicas. 2002.

WOESE, CR. (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci U S A*.97:8392-8396.