

IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS EUCARIÓTICOS PRESENTES NO RIO PARAÍBA DO SUL POR SEQÜENCIAMENTO PARCIAL DO GENE SSU rRNA 18S

Castro EV, Di Benedette JPT, Crespim E, Nóbrega FG

Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Genética Molecular e Genomas, Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova - 12244-000 - S. J. dos Campos-SP
(012) 39471119, ericadecastro18@yahoo.com.br

Resumo - O ambiente aquático representa um habitat ecológico diverso sendo importante recurso ambiental. Desta forma, o presente trabalho busca identificar, através de métodos moleculares, microorganismos eucariotos presentes em 4 pontos distintos no Rio Paraíba do Sul, dentro dos limites do município de São José dos Campos, através do seqüenciamento do gene que codifica para o RNA ribossomal 18S. As seqüências genéticas obtidas permitiram identificar filotipos presentes nas amostras através da comparação com o banco de dados GenBank, resultando num total de 527 identidades, apontando para 209 filotipos dos quais 53% apresentaram similaridade inferior ao valor estabelecido para caracterizá-las como a espécie indicada no mesmo e podem representar organismos ainda não descritos.

Palavras-chave: microbiologia ambiental, microorganismos eucariotos, diversidade, Rio Paraíba do Sul.
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A aplicação de métodos moleculares para estudar ecossistemas microbianos naturais sem a tradicional necessidade de cultivo resultou na descoberta de diversas linhagens evolutivas insuspeitadas (Pace, 1997). A recente descoberta da diversidade filogenética de microorganismos eucariotos de amostras ambientais de oceanos, lagos, pântanos salgados e habitats ácidos têm expandido debates sobre a extensão e origem desses microorganismos (RICHARDS, 2005).

Adicionalmente, o conhecimento da microbiota de um ecossistema fornece padrões de diversidade de microorganismos que podem ser usados para monitoração e predição de mudanças ambientais (LOWE & PAN, 1996).

O ambiente lótico estabelece um diverso habitat ecológico e um importante recurso ambiental, existindo aproximadamente 250.000 Km³ de água doce na Terra, habitados por uma enorme diversidade de microorganismos eucariotos (DIEZ *et al*, 2001)

A bacia do rio Paraíba do Sul drena uma das regiões mais desenvolvidas do país, que abrange cerca de 13.900 Km² no Estado de São Paulo, na região denominada Vale do Paraíba paulista, 20.700 Km² no Estado de Minas Gerais, numa área denominada Zona da Mata Mineira, e 20.900 Km² no Estado do Rio de Janeiro, de acordo com SERVIÇO DE INFORMAÇÕES DA BACIA DO PARAÍBA DO SUL (2004). Em decorrência da poluição, esta bacia tem sofrido com a degradação dos seus recursos hídricos.

O presente trabalho teve o objetivo principal de retratar a diversidade de microorganismos eucarióticos das águas do Rio Paraíba do Sul, tomando-se como base quatro pontos de coleta, através do seqüenciamento do gene da subunidade ribossomal 18S.

Material e Métodos

Amostras de 250 mL de água foram coletadas em 4 pontos distintos do rio Paraíba do Sul. A região 1 localizada sob as coordenadas S 23°12' 36.5" e W 45° 56' 57.0", região 2 S 23° 10' 27.9" e W 45° 54' 46.1", região 3 S 23° 0.9' 41.7" e W 48° 52' 54.0" e região 4, localizada no bairro Vale dos Pinheiros, conhecida como Vidoca (coordenadas geográficas não obtidas). Deste material um volume de 100mL de cada amostra foi concentrado por centrifugação a 6000 rpm, e o material precipitado foi utilizado para a extração do DNA de acordo com Ogram (1998).

Para a construção das bibliotecas de rDNA o gene de rRNA 18S foi amplificado por PCR utilizando iniciadores específicos para eucariotos, segundo Medlin e colaboradores, (1998). As seqüências dos iniciadores senso (A) e antisenso (B) são:

A - 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'

B - 5'TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'

Cerca 10 ng de DNA extraído das amostras de cada região de coleta foram adicionadas a misturas de reação contendo tampão para PCR (INTROVIGEN), 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 5 pMoles de cada iniciador, 0,2 U/μL de Taq DNA polimerase (INTROVIGEN), em um volume total

de 50 µL. As condições de reação, em termociclador PTC-100 (HYBAID) foram: uma desnaturação inicial de 2 minutos à 95°C, 30 ciclos de: 95°C por 1 minutos, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e os fragmentos correspondentes ao tamanho desejado (1800 pb) foram extraídos do gel e purificados com o conjunto Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), quantificados por espectrofotometria de fluorescência e uma alíquota de 2 µL (~80ng) do produto purificado foi utilizada para clonagem em vetor TOPO-TA (INVITROGEN), seguindo-se os protocolos fornecidos pelos fabricantes.

Os produtos da clonagem, num volume de 6µL de cada uma das 4 reações, foram então introduzidos por transformação na linhagem DH5α de *E. coli*, utilizando-se o método que inclui tratamento com CaCl₂ e choque térmico descrito por Sambrook e colaboradores, (2001). As células foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB (Luria Broth – 10% Bacto Tryptone, 5% Bacto Yeast extract, 10% NaCl, 0,5% dextrose) juntamente com 50µg/mL de ampicilina e 20µg/mL de X-Gal (USB) para seleção das colônias contendo o vetor com o inserto e então incubadas até o dia seguinte a 37°C. Os clones obtidos foram inoculados em microplacas estéreis contendo meio LB com 8% de glicerol. Após incubação pela noite à 37°C as placas foram armazenadas a –80°C.

A extração dos plasmídios foi realizada utilizando um protocolo adaptado de Holmes D.C. e Quigley M. (1981) que inclui uma etapa de alta temperatura e foi modificado por Marra *et al* (1999) para uso em forno microondas.

O seqüenciamento de DNA foi realizado em microplacas de 96 poços, onde em cada poço, um volume de 7 µL de cada amostra de DNA plasmidial, 2 µL Dyeamic ET Terminator (AMERSHAM) e 1,5 pMol de iniciador M13-F (5' TAATACGACTCACTATAGGG) foram misturados e levados ao termociclador sob as seguintes condições de reação: desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos ; 35 ciclos de: 95°C durante 30 segundos, 50°C durante 20 segundos e 68°C durante 2 minutos. Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados adicionando a cada poço 4 volumes de isopropanol a 75%, centrifugando-se as placas em seguida a 4000 rpm durante 20 minutos. Descarta-se o sobrenadante, seca-se as amostras invertendo-se as placas sobre papel absorvente. Após secas, as amostras devem ser reconstituídas em 10µL de tampão de formamida e analisadas no seqüenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (APPLIED BIOSYSTEMS).

Os cromatogramas obtidos do seqüenciamento foram preparados para análise utilizando-se os

programas PHRED e CROSSMATCH. O primeiro analisou a qualidade dos cromatogramas: seqüências maiores que 200 nucleotídeos, com índice de qualidade igual ou maior que 20 foram consideradas para alinhamento com o banco de dados. O segundo programa procurou resíduos de vetor que pudessem estar incorporados às seqüências, permitindo sua remoção.

A busca por identidades com seqüências presentes no GenBank foi realizada utilizando o algoritmo "blastn" através do programa "netblast" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

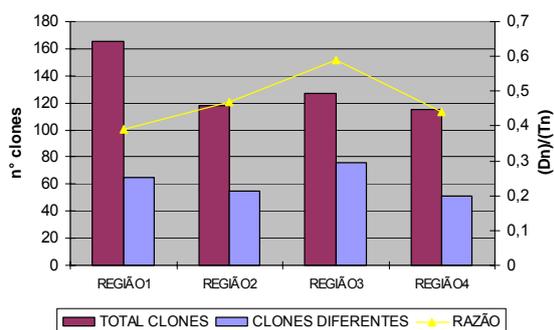
Resultados

As seqüências parciais obtidas utilizadas na análise apresentaram uma média de 380 bases e índice de qualidade PHRED igual a 20, padrão recomendado por Hall, (2004). As buscas por similaridades no GenBank (NCBI) resultaram ao todo em 527 alinhamentos, com *e-value* próximo de zero (0,0) e identidade entre 84% a 100%. De acordo com Schloss, 2004 e outros autores, diferenças de aproximadamente 3% nas seqüências podem significar que se trata de outra espécie. Já diferenças de 5% podem ser atribuídas à diferentes gêneros e diferenças superiores a 20%, à filos diferentes. Com base nessas considerações os resultados do alinhamento BLAST que apresentaram similaridade maior que 97% foram considerados como a espécie indicada no GenBank. Abaixo disso pode-se considerar o organismo apenas como um táxon próximo do indicado, porém não necessariamente o indicado, sendo chamado apenas de "fototipo".

A Figura 1 demonstra os 527 clones de todas as regiões analisadas, sendo que na região 1, representada por 165 clones, apenas 65 táxons diferentes foram encontrados, dentre eles, o gênero mais abundantemente representado foi o *Clamydomonas*, com 34 clones. Nos 118 clones que representaram a região 2, 55 táxons diferentes puderam ser encontrados sendo o gênero *Stenostomum* o mais abundante em número de clones (35 clones). A região 3, representada por 127 clones com 67 táxons, apresentou o maior número de clones com organismos não identificados ou com percentual de identidade baixo (<97%), porém apresentou a maior variedade de organismos representados nos clones das 4 regiões. Entre os 117 clones (45 taxons) representantes da região 4, o gênero *Colpidium* e outros eucariotos, não identificados ainda no GenBank, foram os mais representados.

Pode-se observar que a região 1 apresentou a menor variedade, enquanto a região 3, a segunda em número de clones, apresentou maior variedade de organismos.

Figura 1 - Gráfico da frequência de táxons diferentes (Dn), comparado com o n° total de clones (Tn) para cada região e a razão (Dn)/(Tn).



A abundância de cada táxon em cada região é mostrada na Tabela 1. Nota-se que na região 1 há um grande predomínio de clorófitas, muito diferente das outras regiões.

Na região 2, o filo mais abundante foi o dos platelmintos, sendo na sua maioria representantes do gênero *Stenostomum*. A região 3 apresentou um número bastante grande de eucariotos ainda não classificados e um número alto de Diatomáceas. Na região 4 apenas ciliados e eucariotos ainda não identificados tiveram presença significativa.

Nenhum táxon no nível de espécie foi encontrado ocorrendo ao mesmo tempo nas 4 regiões estudadas. No entanto, no nível de filo, foram encontrados rotíferos, algas verdes, fungos e ciliados nas quatro regiões.

Os microorganismos mais representados foram ciliados e microalgas, que são de grande importância em ecossistemas aquáticos, pois são responsáveis por parte da produção primária, com os protistas ciliados representando um segundo nível trófico. No ecossistema lótico, as mudanças ambientais são mais rápidas e menos previsíveis (HYNES, 1970). Portanto, as algas, por estarem imersas no meio, podem ser sensíveis às propriedades físico-químicas do local onde vivem.

As clorófitas que predominaram na região 1, em sua maioria representantes do gênero *Chlamydomonas*, podem estar associadas à presença de nitratos, resultante da decomposição da matéria orgânica pelas nitrobactérias (ALLAYA *et al.*, 2002), no início de um processo de eutrofização (THOMMAN e MUELLER, 1987).

Tabela 1 - Representação da abundância dos táxons encontrados em cada região, através do número de clones obtidos para cada táxon, indicando entre estes o número de clones com percentual de similaridade abaixo de 97%.

TAXON	R1		R2		R3		R4	
	>97%	<97%	>97%	<97%	>97%	<97%	>97%	<97%
<i>Annelidae</i>			1					
<i>Apicomplexa</i>	7				3	2		
<i>Ascomycota</i>	1		7	5	1	1	6	5
<i>Bacillariophyceae</i>	7	2	19	19	12	12		
<i>Basidiomycota</i>			1	1			1	1
<i>Chlorophyceae</i>	69	45	1	1	4	1	2	2
<i>Choanoflagellida</i>	1	1						
<i>Chrysophyceae</i>	8	1	4	2	2	1		
<i>Chytridiomycota</i>	1		3	3	4	2		
<i>Ciliophora</i>	36	11	20	13	27	17	62	16
<i>Crustacea</i>	1		1	1				
<i>Cryptomonida</i>	11	1	8	4				
<i>Dinoflagellida</i>	1	1					1	1
<i>Euglenida</i>					27	17	1	1
<i>Eukarya sem class.</i>	11	10	10	8	2	2	31	1
<i>Fungi sem class.</i>							1	
<i>Kinetoplastida</i>					25	23		
<i>Labyrinthulida</i>			2	1				
<i>Nematoidea</i>					2	2		
<i>Oomycota</i>			1	1	1	1		
<i>Platyhelminthes</i>	1		35	17	2	2		
<i>Rhodophyceae</i>					3	1		
<i>Rotifera</i>	1		2	2	11	5	2	
<i>Zygomycota</i>	1	1					2	2

Discussão

O predomínio das clorofíceas na região 1 pode estar associado à presença de nitratos resultante da decomposição da material orgânico (ALLAYA et al, 2002) no início do processo de eutrofização (THOMMAN e MUELLER, 1987).

Na região 2 a presença em grande número desses tubelários pode estar associado a coleta de água próximo das raízes de macrófitas, que constitui seu substrato mais comum (NOREÑA et al., 2004).

A região 3 revelou estes resultados por ser uma comunidade diferenciada das outras, talvez pela confluência do rio Jaguari próximo ao ponto de coleta nesta região.

Na região 4 a presença de apenas ciliados e eucariotos ainda não identificados é de certa forma esperado por ser uma região poluída e em estado de eutrofização, desta forma uma população bacteriana ocupa todos os nichos que poderiam ser ocupados por outros táxons (THOMMAN e MUELLER, 1987).

Conclusão

A metodologia demonstrou eficiência na detecção e identificação de microorganismos eucarióticos, fornecendo pistas para a identificação de espécies não cultiváveis ou ainda não descritas.

Um total de 252 seqüências apresentaram similaridade suficiente com espécies de microorganismos eucarióticos conhecidos presentes no GenBank, e um total de 275 seqüências apresentaram similaridade inferior a valor estabelecido para caracterizá-las como a espécie indicada no mesmo, ou seja, 53% das seqüências podem representar organismos ainda não descritos, pelo menos no Gen Bank.

Este estudo ainda será concluído com o seqüenciamento antisense dos clones presentes em nossa biblioteca de forma a consolidar os dados obtidos, para que seja possível a construção de árvores filogenéticas e obtenção de uma estimativa da riqueza de espécies em cada região de coleta.

Referências

- ALLAYA, H.; BOUR, M. El; OUADA, H. B. and ABED, A. El. **Etude comparative des interrelations entre bactéries et microalgues au cours de l'épuration des eaux usées par lagunage naturel et Chenal Algal à Haut Rendement**, RESUMOS SEMINÁRIO INTERNACIONAL - Réutilisation des eaux usées traitées et des sousproduits de l'épuration : Optimisation, Valorisation & Durabilité – TUNIS - TUNISIA - 2003
- DIEZ, B.; PREDROS-ALIO, C. and MASSANA, R. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. **Appl Environ Microbiol** 67: 2932-2941, 2001.
- HALL, B. G., **Phylogenetic trees made easy: a how to manual**. Sinauer Associates, Massachusetts, 2 edition, 2004.
- HYNES, H.B.N., **The ecology of running waters**. Liverpool University Press, Toronto, 1970.
- LOWE, R. L.; PAN, Y. Phylogenetic trees made easy: a how to manual. In: Stevenson. R. J.; Bothwell, M. L.; Lowe, R. L. **Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems**. EUA, Ed. Academic Press, 1996.
- MEDLIN, L. et al. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-Like rRNA-coding regions. **Gene**. V.71, p. 491-499, 1998.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. (Acesso em 04 jun. 2006).
- OGRAN, A. Isolation of nucleic acids from environmental samples. In: Burlage, R. S.; Atlas, R.; Stahl, D.; Geesey, G. and Saylor, G. **Techniques in Microbial Ecology**. Oxford, NY, 1998.
- PACE, N.R. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. **Science**. V. 276, 734-740, 1997.
- RICHARDS, T. A., VEPRITSKIY, A. A., GOULIAMOVA, D. E. and NIERRZWICK-BAUER, S.A. The molecular diversity of fresh water picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages. **Environmental Microbiology**. Sep;7(9):1413-25 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F and MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold spring harbor laboratory, 2001.
- THOMANN, R.V.; MUELLER, J.A., **Principles of Surface Water Quality Modeling and Control**, USA: Harper & Row Pub, 1987.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS G.D.; GIBSON T. J. and CLUSTAL W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. V.22, p.4673-4680, 1994.