

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *alkB* EM UM CONSÓRCIO BACTERIANO
ISOLADO DAS ÁGUAS DO RIO NEGRO COM POTENCIAL BIORREMEDIADOR**

João Victor de Lira Ribeiro
Universidade Federal do Amazonas
joao.ribeiro@ufam.edu.br

Edmar Vaz de Andrade
Universidade Federal do Amazonas
edandrade@ufam.edu.br

Isabelle Bezerra Cordeiro
Universidade Federal do Amazonas
icordeiro@ufam.edu.br

RESUMO

Devido aos episódios recorrentes envolvendo o derrame dos poluentes em ambientes aquáticos e terrestres, em especial na região amazônica, onde o transporte fluvial ainda é bastante comum, explorar microrganismos com potencial biorremediador é de extrema importância científica. Diferentes gêneros bacterianos tiveram suas respectivas atividades metabólicas associadas à degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo, principalmente alcanos. O gene *alkB* é o responsável por regular a expressão da alcano 1-monoxigenase, proteína envolvida na degradação de alcanos por determinadas bactérias. O objetivo do projeto foi avaliar a presença deste gene nas cepas de um consórcio bacteriano isolado das águas do Rio Negro (AM) em uma localidade afetada por derrame de diesel. Para isso, foram realizados o isolamento e cultivo das cepas, obtenção do DNA genômico, análises genômicas e ensaios de Biologia Molecular por PCR. Neste trabalho, obteve-se o isolamento do DNA genômico das cepas constituintes do consórcio A3, a identificação das cepas bacterianas pelo método 16S rRNA e o desenho de iniciadores degenerados para um conjunto de populações bacterianas isoladas do ambiente amazônico. As perspectivas deste trabalho são obter amplificações gênicas que apontem a presença do gene *alkB*, corroborando com os já elucidados por *Acinetobacter junii* SB132, conhecida na degradação de alcanos.

Palavras-Chave: microrganismos; alcanos; biodegradação; diesel; PCR.



1. INTRODUÇÃO

Os alcanos representam uma fração considerável de toda a constituição química do petróleo, além de serem isolados e obtidos a partir da exploração deste recurso e do gás natural. Em decorrência de suas propriedades e de seu alto valor comercial, os alcanos são comercializados como constituintes da maioria dos produtos petrolíferos em larga escala, como o querosene, gasolina e óleo diesel (Liang *et al.*, 2005).

A presença indevida deste combustível no ambiente aquático e terrestre tem representado uma das principais preocupações ambientais nas últimas décadas, pois sua presença no ambiente pode desencadear alterações irreversíveis em comunidades biológicas e microbianas. A região amazônica é uma localidade extremamente vulnerável a acidentes envolvendo o derrame de petróleo e diesel por conta das embarcações que fazem o transporte ou utilizam ambos os combustíveis.

Sabe-se que comunidades microbianas desempenham funções importantes em diversos processos ecossistêmicos, incluindo a remediação de ambientes contaminados por petróleo. Duas principais classes de alcano hidroxilases (AHs) tem suas respectivas atividades enzimáticas associadas a degradação de alcano por bactérias e no processo de recuperação melhorada do petróleo, uma delas trata-se da alcano 1-monoxigenase, proteína envolvida na degradação de alcanos por determinadas bactérias e cuja expressão é regulada pelo gene *alkB* (Nie *et al.*, 2014; Souza-Neto, 2019).

O presente projeto se propôs a investigar a presença do gene *alkB* em um consórcio bacteriano isolado da região amazônica. Para isso, foram realizados ensaios de biologia molecular por PCR combinado a algumas ferramentas de bioinformática para o desenho de *primers* degenerados e análise de outros resultados. Os resultados do projeto apresentam, de forma preliminar, um avanço no conhecimento sobre microrganismos com potencial remediador isolados da Amazônia e podem fornecer subsídios para outros estudos nessa temática.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença do gene *alkB* nas cepas constituintes do consórcio bacteriano A3 isolado das águas do Rio Negro.

3. METODOLOGIA

Reativação e isolamento das cepas do consórcio A3 e *A. junii* SB132

A reativação dos isolados bacterianos foi feita em meio Bushnell-Haas (BH) líquido acrescido com 1% de óleo diesel, a 30°C e 150 rpm por um período *overnight*. Os pré-inóculos (5 mL) foram preparados em meio BH/diesel (1%) e incubados sobre as mesmas condições de temperatura e rpm descritas acima por 48 horas para a extração individual do DNA genômico (gDNA) das cepas do consórcio.

Extração e quantificação do DNA genômico das cepas constituintes do consórcio A3 e *A. junii* SB132

O gDNA das células bacterianas foi extraído utilizando o kit *Soil DNA Isolation Plus Kit* (TIANGEN), seguindo as especificações do fabricante. As amostras purificadas foram submetidas individualmente a métodos fluorimétricos com auxílio do sistema Qubit® 2.0. Para a leitura, foi utilizado 2 µL de cada amostra com o gDNA extraído.

Análise por eletroforese em gel de agarose

Nesta etapa, 5 µL de DNA genômico purificado de cada cepa bacteriana e 5 µL de solução de azul de bromofenol foram analisados em gel de agarose 0,8%. A eletroforese foi estabelecida a uma voltagem de 70V, por aproximadamente 45 minutos.



Identificação bacteriana das cepas constituintes do consórcio A3 por sequenciamento de DNA

Os gDNAs extraídos das cepas do consórcio A3 foram amplificados pela técnica de PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), 16S400F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' e 16S400R: 5'-GGGACTACCAGGGTATCTAAT-3'.

O preparo da reação de sequenciamento foi realizado com o kit DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Bioscience). A leitura das amostras foi realizada no Sequenciador 3500 *Genetic Analyzer*, da Applied Biosystems. Para a análise do sequenciamento e montagem dos *contigs*, foi utilizado o programa *Electropherogram quality analysis* (Embrapa). As sequências nucleotídicas foram submetidas à ferramenta *Nucleotide BLAST* com acesso ao banco de dados do NCBI. Para a identificação dos isolados, os *contigs* obtidos foram utilizados para buscar microrganismos com sequências semelhantes no GenBank. *A. junii* SB132 foi utilizada como controle positivo nesta etapa.

Desenhos dos *primers* degenerados para amplificação do gene *alkB*

Com base em regiões conservadas, foram desenhados dois pares de *primers* degenerados para a detecção e amplificação do gene *alkB* por PCR. Os *primers* foram desenhados com base em sequências do gene *alkB* identificados em microrganismos isolados da região amazônica e disponíveis no acervo do Laprot e da Embrapa Amazônia Ocidental. Cada sequência, de forma individual, foi submetida ao alinhamento no software *ClustalW*. Para o desenho dos *primers* degenerados, foram selecionadas as regiões conservadas de cada alinhamento realizado. Os dois pares de *primers* degenerados foram nomeados como: Alk2 (baseado na sequência de *alkB* disponível no Laprot) e Alk3 (baseado na sequência de *alkB* disponível no acervo da Embrapa Amazônia Ocidental).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento das cepas constituintes do consórcio A3 e *A. junii* SB132

A partir da reativação e crescimento das cepas do consórcio A3, foram isoladas três colônias bacterianas de aspectos morfológicos distintos. As respectivas colônias foram nomeadas como A313, A314 e A316 (**Tabela 1**), e descritas inicialmente por Santos (2021).

Determinados microrganismos constituintes de um consórcio podem ter a capacidade de secretar importantes enzimas que degradam hidrocarbonetos, outros podem produzir biomoléculas, como os biossurfactantes, pois um consórcio bacteriano é nutricionalmente mais versátil quando comparado a uma única cepa isolada (Nozari *et al.*, 2018). Em uma população variada de microrganismos, a capacidade enzimática de diferentes bactérias pode aumentar progressivamente a taxa e extensão da biodegradação do petróleo (Patowary *et al.*, 2016).

Extração, quantificação e análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% dos gDNAs.

A análise eletroforética demonstrou a integridade dos DNA genômicos extraídos, tendo as seguintes quantificações por cepa: *A. junii* SB132 (22.3 ng/μL), A313 (8.5 ng/μL), A314 (14.4 ng/μL) e A316 (24.9 ng/μL). Para a identificação dos isolados, os *contigs* obtidos neste trabalho foram utilizados para buscar microrganismos com sequências semelhantes no GenBank. A partir do resultado obtido pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, foram identificadas linhagens bacterianas à nível de gênero (*Pseudomonas* sp.) e à nível de espécie (*Acinetobacter seifertii* e *Achromobacter xylosoxidans*) conforme indicado na **Figura 1**.

Tabela 1: Identificação das cepas do consórcio A3 pelo sequenciamento da região do 16S rRNA.



Cepa	Identificação	Contigs	Similaridade
A313	<i>Acinetobacter seifertii</i>	1	99.57%
A314	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2	98.57%
A316	<i>Pseudomonas</i> sp.	3	100.0%
<i>A. junii</i> SB132	<i>Acinetobacter junii</i>	4	100.0%

Os microrganismos caracterizados neste projeto já foram apontados como possíveis candidatos para a biorremediação de áreas contaminadas por poluentes, sobretudo espécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter*. Esse comportamento também já foi descrito para *Pseudomonas* particularmente pela eficácia em degradar componentes tóxicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), como o benzeno, tolueno, fenol e o pireno (Mukherjee *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018). A expressão do gene *alkB* foi associada a esta capacidade catabólica apresentada por *Pseudomonas*.

A presença do gene *alkB* em *Achromobacter xylosoxidans* foi descrito pela primeira vez por Tanase *et al.* (2013) e ainda há poucos estudos publicados que elucidem a eficácia de biodegradação de hidrocarbonetos pelo microrganismo. De modo geral, os dados genômicos sobre *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Achromobacter* estão disponíveis e oferecem informações relevantes que podem auxiliar na interpretação dos resultados obtidos para este projeto.

Primers degenerados e amplificação do gene *alkB*

Os primers desenhados neste trabalho estão apresentados na **Tabela 2**. As temperaturas ótimas de anelamento para cada par de iniciadores foram definidas inicialmente através de ensaios com gradientes de temperaturas de 40 °C a 50 °C. Para os pares de primers Alk2 e Alk3, as temperaturas de 47,9 °C e 40 °C, respectivamente, demonstraram ser as mais eficientes em comparação às demais temperaturas testadas (**Figura 2**).

Tabela 2: Características dos primers de PCR utilizados no estudo.

Identificação do primer	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do produto (pb)
Alk2FW	CVCAYGARYTNABYCA	47,9 °C	537
Alk2Rev	TGRTSBGARTGVCG	47,9 °C	537
Alk3FW	GGSCAYTTCTWCRTSG	40 °C	360
Alk3Rev	GGAACAGGTTSSTSAC	40 °C	360

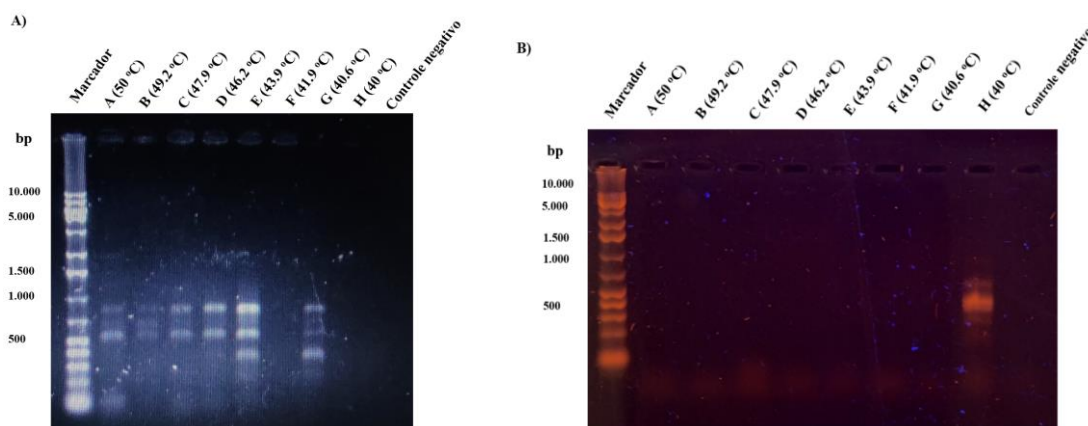


Figura 2: Gel de agarose 0.8% (m/v) com os produtos do gradiente de temperatura de PCR avaliando o par de iniciadores Alk2 e B) Alk3. Amostra avaliada: *A. junii* SB132.



As cepas do consórcio A3 não apresentaram nenhum produto de amplificação na reação avaliando o par de *primers* Alk2 e Alk3. Também foi constatada a ausência de um produto de amplificação no controle positivo (*A. junii*), que havia anteriormente funcionado. Os componentes da reação (tampão, DNA, *primers*, dNTP, MgCl₂, Taq) e demais parâmetros de termociclagem foram checados e os ensaios repetidos. Todos sem indícios de degradação e/ou contaminação.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível isolar as cepas do consórcio A3 e identificá-las através de ensaios de biologia molecular. Os ensaios de PCR revelaram uma ausência da amplificação de *alkB* pelas cepas do consórcio A3 com o conjunto de *primers* testados. O redesenho dos iniciadores encontram-se nas perspectivas deste trabalho, pois eles podem permitir uma detecção deste gene em cepas isoladas da região amazônica e confirmar essa propriedade com auxílio de outras técnicas de biologia molecular e bioinformática.

REFERÊNCIAS

- Liang, F.; Lu, M.; Keener, T. C.; Liu, Z.; Khang, S. J. **The organic composition of diesel particulate matter, diesel fuel and engine oil of a non-road diesel generator.** *J. of Environmental Monitoring*, v. 7, n. 10, p. 983-87, 2005.
- Mukherjee, A. K.; Bhagowati, P.; Biswa, B. B.; Chanda, A.; Kalita, B. **A comparative intracellular proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* strain ASP-53 grown on pyrene or glucose as sole source of carbono and identification of some key enzymes of pyrene biodegradation pathway.** *J. Proteomics*, v. 167, p. 25-25, 2017.
- Nie, Y.; Chi, C. Q.; Fang, H.; Liang, J. L.; Lu, S. L. *et al.* **Diverse alkane hydroxylase genes in microorganism and environments.** *Scientific Reports*, v. 4, 2014.
- Santos, J. F. **Sinergismo entre cepas de um consórcio bacteriano degradador de diesel isolado do Rio Negro.** Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, 2021.
- Souza Neto, J. N. **Caracterização genômica de *Acinetobacter junii* SB132 degradadora de diesel e sua interação com substratos hidrofóbicos.** Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, 2019.
- Tanase, A.; Ionescu, R.; Chiciudean, I.; Vassu, T.; Stoica, I. **Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 84, p. 150-154, 2013.
- Wang, L.; Wang, W.; Lai, Q.; Shao, Z. **Gene diversity of CYP153A and *alkB* alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean.** *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 5, p. 1230-1242, 2010.
- Xu, X.; Liu, W.; Tian, S.; Wang, W.; Qi, Q. *et al.* **Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis.** *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

AGRADECIMENTOS

UFAM, ICB, FAPEAM, Laprot e CAM/UFAM.