

# CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE DE CIANOBACTÉRIAS EM AMBIENTES ORIZÍCOLAS UTILIZANDO PERFIS DE PCR-DGGE DO GENE CPCBA-IGS

Michele Pittol<sup>1</sup>; Catusca Reali<sup>2</sup>; Graziela Gonçalves Scheer<sup>3</sup>; Victor Hugo Valiati<sup>4</sup>, Lidia Mariana Fiuza<sup>5</sup>

Palavras-chave: lâmina d'água, orizicultura irrigada, bactérias fotoautotróficas.

## INTRODUÇÃO

As cianobactérias são micro-organismos aeróbicos fotoautotróficos que fazem parte da comunidade fitoplanctônica (CASTENHOLZ, 2001). Estes organismos contribuem com a produtividade primária e fluxo de energia em ecossistemas eutrofizados (FERRÃO-FILHO et al., 2009). A capacidade de crescimento em diversos ambientes é uma das características marcantes deste filo bacteriano. No contexto do ecossistema orizícola a introdução de nutrientes via manejo e irrigação, torna o ambiente propício para o desenvolvimento e permanência de assembléias de cianobactérias.

Pigmentos como a clorofila-a, a ficocianina e ficoeritrina, são substâncias do aparato fotossintético cianobacteriano (NEILAN et al., 1995; BOLCH et al., 1996), sendo a região do espaço intergênico da ficocianina (*cpcBA-IGS*) utilizada para discriminar linhagens de cianobactérias em ambientes de água doce (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2009).

O presente trabalho teve como objetivo monitorar a flutuação da comunidade de cianobactérias na lâmina d'água de lavouras orizícolas e ecossistemas associados, utilizando perfis de PCR-DGGE do gene *cpcBA-IGS* (região de espaço intergênico entre os genes *cpcB* e *cpcA*), avaliando sua dinâmica em relação às características físico-químicas da água de irrigação, lavoura e drenagem, em três períodos de cultivo (preparo do solo, fases vegetativa e reprodutiva).

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de 800 mL de água foram coletadas, em triplicata, da lâmina superficial em pontos de irrigação (I), lavoura (L) e drenagem (D) de sistemas orizícolas, nos anos agrícolas de 2011/12 e 2012/13, no município de Viamão, RS (S 30°05'00" e W 50°47'00"). Estas amostras foram conservadas a 4 °C (CLESCERI et al., 1998), até o encaminhamento para o Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da Unisinos. Os períodos de coleta foram classificados em: pré-plantio (P), fase vegetativa (V) e fase reprodutiva (R). Os parâmetros físico-químicos analisados foram: temperatura da água (°C), nitrogênio (N) (mg/L), fósforo (P) (mg/L), potássio (K) (mg/L) e cálcio (Ca) (mg/L) (TEDESCO et al., 1995). Estes parâmetros foram fornecidos pela equipe de agronomia da Estação Experimental do Arroz, do Instituto Rio Grandense do Arroz (EEA-IRGA).

A amplificação da região espaçadora intergênica do operon da ficocianina (*cpcBA*) foi realizada utilizando os *primers* *cpcBF* e *cpcAR* (ROBERTSON et al., 2001), seguindo protocolos definidos por Crosbie et al., (2003). Os amplicons foram submetidos à Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), com gradiente de 40 a 70 % de

---

<sup>1</sup> Mestre em Biologia, PPG em Biologia - Unisinos, Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS, e-mail: mpittol@ibest.com.br.

<sup>2</sup> Mestre em Biologia, PPG em Biologia - Unisinos, Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS.

<sup>3</sup> Bióloga, Pesquisadora do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA).

<sup>4</sup> Doutor em Genética e Biologia Molecular, PPG em Biologia - Unisinos - Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS.

<sup>5</sup> Doutora em Agronomia, PPG em Biologia - Unisinos - Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS.

uréia e formamida. Após a eletroforese em corrente elétrica de 75 volts, a 60 °C, por 16 horas, o gel foi corado com SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen), diluído em tampão TAE 1x, por 1 hora e fotodocumentado em transiluminador de luz ultravioleta utilizando o programa Carestream (Molecular Imaging Software versão 5.3.1).

Os perfis de bandas, dados de presença e ausência para cada um dos pontos de irrigação, lavoura e drenagem nas fases pré-plantio, vegetativa e reprodutiva foram analisados utilizando o coeficiente de similaridade e o método de agrupamento UPGMA (NTSYS-pc program).

Os parâmetros abióticos foram previamente selecionados com a Análise de Componentes Principais (ACP). Estes valores foram selecionados priorizando as variáveis com altas correlações no primeiro eixo de ordenação. De acordo com estes requisitos, foram selecionadas as variáveis: temperatura da água, nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, as quais foram log-transformadas por não apresentarem distribuição normal.

A análise integrada das variáveis abióticas e bióticas foi realizada utilizando a Análise de Correspondência Canônica (ACC). Para tanto, foram utilizados os programas SYSTAT 13 e PC-ORD 5.10.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade de cianobactérias da lâmina d'água de ambientes orizícolas e ecossistemas associados, foi avaliada através da técnica de PCR-DGGE utilizando os iniciadores para o gene *cpcBA*-IGS. O padrão de bandas mostrou a existência de 28 diferentes filotipos, destacando-se a riqueza destes nos pontos de irrigação. Os filotipos encontrados nos diferentes locais apresentam coeficiente máximo de similaridade de 67 %, sendo a maior similaridade observada entre os pontos de lavoura e drenagem da fase reprodutiva, indicando que possuem muitos filotipos em comum. De acordo com os agrupamentos do dendograma, os locais de irrigação e drenagem da fase pré-plantio apresentaram baixo valor de similaridade em comparação com os outros locais de estudo (Figura 1).

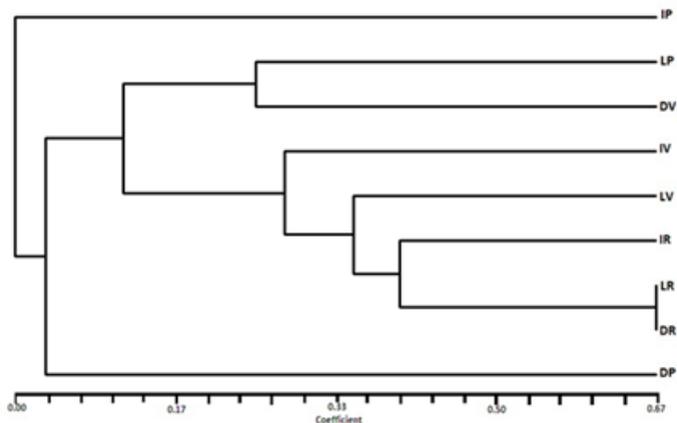


Figura 1. Dendrograma UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade e matriz de dados de presença e ausência de filotipos do gene *cpcBA*-IGS nos diferentes pontos de irrigação, lavoura e drenagem de lavouras orizícolas, localizadas no município de Viamão, RS. A escala numérica indica o grau de similaridade em que agrupamentos são formados de acordo com o coeficiente de similaridade. Os locais e períodos de coleta estão representados por letras, sendo locais irrigação (I), lavoura (L), drenagem (D) e períodos pré-plantio (P), fase vegetativa (V) e fase reprodutiva (R).

A Análise de Correspondência Canônica foi aplicada utilizando uma matriz de presença e ausência de 28 filotipos distribuídos entre as unidades de coleta e ordenados em função de cinco variáveis abióticas (log-transformadas).

A partir dos resultados da ordenação, quando observados os dois primeiros eixos, constata-se que juntos explicam 38,8 % da variância total. No eixo 1 da ordenação, das variáveis ambientais avaliadas, as que melhor explicaram a distribuição dos filotipos cianobacterianos, segundo a correlação de Pearson, foram: temperatura (-0,729) e, no eixo, 2 nitrogênio (-0,580). De acordo com o teste de Monte Carlo, usando 4999 permutações, a ordenação dos auto-valores apresentou resultado significativo ( $p= 0,0034$ ), já a ordenação entre os filotipos e as variáveis ambientais não foi estatisticamente significativa ( $p= 0,1728$ ).

Os pontos da fase de pré-plantio apresentaram-se dispersos no dendograma, sendo o mesmo padrão observado na análise de ACC a qual descreve, simultaneamente, filotipos, fonte de água e variáveis abióticas (Figura 2).

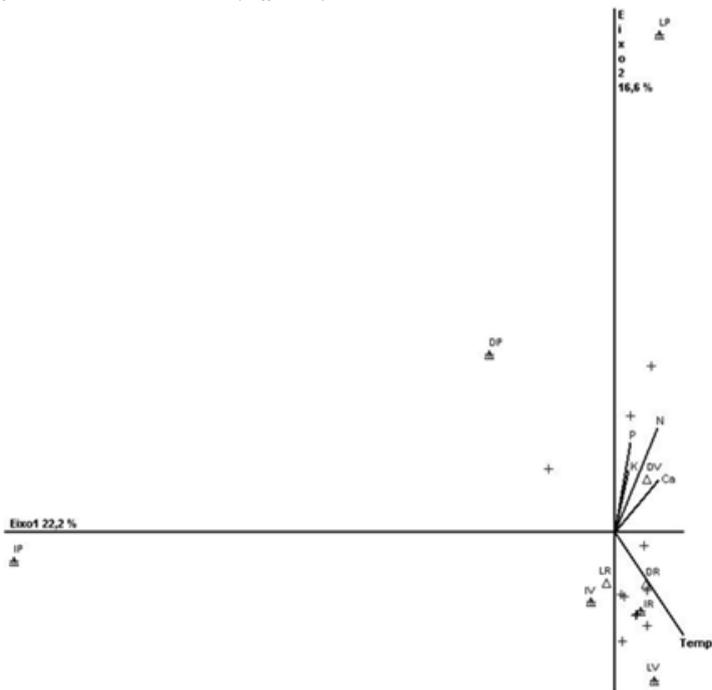


Figura 2. Diagrama de ordenação produzido pela Análise de Correspondência Canônica. As variáveis ambientais estão representadas por vetores (Temp=temperatura; P=fósforo; N=nitrogênio; Ca=cálcio e K=potássio), os filotipos estão representados por triângulos e os locais de coleta e períodos da cultura estão representados por triângulos de acordo com a seguinte legenda: I=irrigação, L=lavoura, D=drenagem, P=pré-plantio, V=vegetativa; R=reprodutiva). Teste de Monte Carlo com 5000 interações.

A maioria das espécies cianobacterianas apresenta um melhor crescimento em ambientes de água doce neutro alcalinos (pH 6-9), temperatura entre 15 a 30 °C e alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (BARBOSA, 2009). Assim, a ocorrência de cianobactérias nos campos de arroz pode ser atribuída ao ambiente favorável, que possui a exigência de luz, água, altas temperaturas e disponibilidade de nutrientes requerida para a sobrevivência destes micro-organismos (DEY et al., 2010).

No período reprodutivo, foram encontrados 17 dos 28 filotipos cianobacterianos

relatados neste estudo, os quais estiveram associados, na ACC, a variável temperatura. Nesse contexto, o aumento gradual na diversidade de cianobactérias ao longo do ciclo da cultura, pode estar relacionado com o aumento da temperatura da lâmina d'água neste período do ano que corresponde aos meses de dezembro e janeiro.

## CONCLUSÃO

A maioria dos filotipos cianobacterianos encontrados estiveram presentes nas amostras de água coletadas na fase reprodutiva da cultura. Esta fase caracteriza-se por altas temperaturas e absorção contínua de N pela planta. Na análise de CCA pode-se observar a relação de P, N, K e Ca com filotipos identificados na fase vegetativa da cultura. Este cenário ecológico confere vantagem competitiva para bactérias que possuem células especializadas na fixação de nitrogênio, bem como para micro-organismos planctônicos que se beneficiam da concentração de nutrientes nos sistemas aquáticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, T. DOS S. **Cianobactérias tóxicas e processos de remoção**. 2009. 68 f. Monografia (Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. DO C. et al. Genetic polymorphism in Brazilian *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) Toxic and Non-Toxic through RFLP-PCR of the *cpcBA*-IGS. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n.4, p. 901-909, 2009.
- BOLCH, C. J. S. et al. Genetic characterization of strains of Cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcba* intergenic spacer and flanking regions. **Journal of Phycology**, v.32, n.3, p. 353-498, 1996.
- CASTENHOLZ, R.W. General characteristics of cyanobacteria. In: GARRITY, G.M (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. Ed. New York: Springer-Verlag, pp. 474-487, 2001.
- CLESCERI, L. S. et al. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. Washington: APHA-AWWA-WPCF, 1998.1162 p.
- CROSBIE, N. D. et al. Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. **Journal of Microbiological Methods**, v.55, p.361-370, 2003.
- DEY, H.S. et al. Occurrence of nitrogen-fixing Cyanobacteria in local rice fields of Orissa, India. **Ecoprint**, v. 17, p.77-85, 2010.
- FERRÃO-FILHO, A. DA S. et al. Ecologia, Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias. **Oecologia Brasiliensis**, v.13, n.2, p. 225-228, 2009.
- NEILAN, B.A. et al. Genetic diversity and phylogeny of toxic Cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p. 3875-3883, 1995.
- ROBERTSON, B. R. et al. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (Cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobillin content. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.861-871, 2001.
- TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.174 p.