



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA COMUNIDADE BACTERIOPLANCTÔNICA EM UMA BAIJA NO LITORAL CENTRO-NORTE CATARINENSE

Erica Cavalli Trembulak, Muriel Deon do Amaral, Ana Luiza Portezani Brandão, Ellen Junker, Gabriela Scholante Delabary, Jurandir Pereira Filho, André Oliveira de Souza Lima

Genética - Genética Molecular e de Microorganismos

A ação humana e as mudanças climáticas são capazes de alterar diversos processos biogeoquímicos dos oceanos causando desequilíbrio ambiental, principalmente, em regiões costeiras ao entorno de estuários, os quais inferem nas cadeias alimentares ao influenciar o desenvolvimento de organismos planctônicos, como bactérias e microalgas. Entre as alterações dos processos biogeoquímicos, a acidificação e a hipóxia têm sido muito debatidas (KEKUEWA et al., 2022), em especial pela alteração do bacterioplâncton presente na estrutura ambiental. Outro processo capaz de desregular a ecologia sistêmica do local é a eutrofização, decorrente do aumento de nutrientes na região, em especial os compostos nitrogenados e fosfato, levando a proliferação massiva de macro e microalgas, aumentando a matéria orgânica e, em seu extremo, levando a uma situação hipóxica pela decomposição mediada pelos micro-organismos, que se utilizam do oxigênio do ambiente em seu processo de respiração. Estes organismos são capazes de efetuar a regulação de ciclos biogeoquímicos oceânicos (WU et al., 2019), como decomposição de matéria orgânica (FUHRMAN, 2009) e fixação de nitrogênio (SCHOFFELEN et al., 2019). Neste âmbito, o DNA ambiental (eDNA) constitui uma estratégia efetiva para a visualização do que acontece na estrutura ecológica do local, em especial por ferramentas de metagenômica e *metabarcoding* com o uso de rDNA (KOBAYAMA et al., 2021). Uma dessas técnicas usa o equipamento MinION, um dispositivo portátil capaz de sequenciar fitas longas de DNA por tecnologia de nanoporos, facilitando assim a identificação molecular e a classificação taxonômica (ASHTON et al., 2014). O município de Balneário Camboriú está localizado no litoral centro-norte de Santa Catarina, sendo um dos principais balneários do Brasil e tendo seu turismo e especulação imobiliária aumentada nos últimos anos, causando interferências antrópicas na sua costa. A região costeira centro-norte de Santa Catarina vem sendo observada por apresentar processos de desequilíbrio ambiental, anteriormente mencionados, correlacionados com hipóxia e eutrofização em específico, os quais tornam-se pouco conhecidos por serem de rápida ocorrência, dificultando ainda mais seu estudo. Uma vez que técnicas como MinION vem sendo mais difundidas, sua utilização para estudos de estrutura ambiental e ecologia nas áreas afetadas supracitadas passa a ser de interesse, por permitirem a visualização e classificação do bacterioplâncton e dos metabolismos que vêm ocorrendo no local e seu impacto ambiental, sendo este o objetivo do trabalho realizado. A amostragem ocorreu em três pontos, na baía de Balneário Camboriú, na isóbata de 5 metros, em setembro de 2022. A coleta de água foi realizada com o auxílio de uma garrafa de Niskin (General Oceanics, Miami, FL, EUA) e armazenada em galões de 5 litros para transporte até o laboratório. Os dados físicos-químicos de temperatura, pH, OD, salinidade e turbidez foi realizado com o uso de uma sonda multiparamétrica YSI 6600 (Pro Plus, Yellow Springs, OH, EUA).



No laboratório, alíquotas de 500mL de água foram filtradas em microfiltro de fibra de vidro de 0,45 μ m com sistema de filtração à vácuo e refiltrada com filtro de celulose de 0,22 μ m, acondicionados, separadamente, em frascos de 5mL estéril e armazenados em freezer -20° para posterior seleção e análise (ZAMORA-TEROL; NOVOTNY; WINDER, 2020). Para a extração de eDNA, foi utilizado o kit comercial MagMAX™ Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation Kit [AODSL1] (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. A quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído foi realizada em espectrofotômetro Tecan M200 Infinite Pro nos comprimentos de onda λ 260nm e λ 280nm. Após foi realizada uma reação de PCR em gel de agarose 1% com 25 μ L de uma solução contendo 50ng de eDNA filtrado, 1x tampão da enzima Taq DNA polimerase (Thermo Fisher), 0,2mM de dNTP (Promega), 0,5mM do primer rRNA 16S; 2mM de cloreto de magnésio; 1U Taq DNA polimerase (Thermo Fisher) e água ultrapura. O programa empregado nas reações de PCR foi de desnaturação inicial a 94°C por 2min, seguido de 35 ciclos com as seguintes condições - desnaturação do DNA por 20seg a 94°C, anelamento dos primers 35seg a 54°C e polimerização a 72°C por 1,5min. Ainda foi incluída uma extensão final de 72°C por 8 minutos. O processo de amplificação foi realizado em termociclador Veriti (Applied Biosystems). Após o processo de amplificação, os produtos das reações (amplicons) foram avaliados por metodologia de eletroforese em gel de agarose (1%). As reações consideradas positivas foram aquelas que resultaram no DNA amplificado de interesse (banda única) com concentração mínima de aproximadamente 20ng/ μ L quando comparados ao marcador molecular (Lambda HindIII). Após a amplificação, foi realizada a construção da biblioteca com as correções e ajustes necessários, utilizando o kit Ligation Kit SQK-LSK112 (Oxford Nanopore). O ajuste enzimático foi realizado com o produto Companion Module for Oxford Nanopore Technologies® Ligation Sequencing (New England Biolabs). A biblioteca foi sequenciada no dispositivo MinION (Oxford Nanopore) por meio do uso de uma célula flowcell (FLO MIN112, Oxford Nanopore), utilizando o software MinKNOW (Oxford Nanopore) no controle do processo e o software EPI2ME Labs (Oxford Nanopore) para classificação taxonômica das sequências processadas, as quais foram determinadas utilizando o gene rRNA 16s na plataforma BLASTn com o auxílio do banco de dados NCBI. Os dados físico-químicos tiveram resultados considerados normais, com pH entre 8,2 e 8,4, salinidade média de 32% (água salgada), temperatura da água de 18,85°C e OD de 6,34 mg/L-1 (ponto 1) e 7,02 mg/L-1 (pontos 2 e 3). Estes dados físico-químicos não demonstraram alterações ambientais no momento de coleta. Como dado genético, foram encontradas 675 espécies bacterianas de 13 filos diferentes. O filo mais abundante foi o Proteobacteria, esse é comumente ligado a organismos ambientais, seguido de Bacteroida, Actinobacteria e Abditobacteriota. Ao analisar a função dos organismos em si, 19 espécies de bactérias podem estar relacionadas a parâmetros de alterações ambientais, principalmente eutrofização, com atenção especial *Sandarakinorhabdus cyanobacteriorum*, uma bactéria sequenciada em um lago eutrofizado (CAI et al., 2018), a qual foi encontrada em uma amostra em frente a desembocadura do rio Marambaia. Outras espécies de bactérias encontradas nessa amostra estão relacionadas a algas, como é o caso da *Sulfitobacter alexandrii*, uma



bactéria promotora de crescimento de microalgas (YANG et al., 2021). Essa localização recebe um grande aporte de nutrientes oriundos da drenagem superficial urbana da região central de Balneário Camboriú, a qual pode vir a desencadear um evento de eutrofização na área, ocorrendo bloom de macro e microalgas, derivado por processo de decomposição da matéria orgânica, podendo causar hipóxia é possível correlacionar os dados obtidos com o processo em questão. Outro indício de ação antrópica nos locais analisados é a presença de bactérias relacionadas com a degradação de hidrocarbonetos, comumente ligados a plásticos como a *Oleibacter marinus* (TERAMOTO et al., 2011) e *Croceimicrobium hydrocarbonivorans* (LIU et al., 2021). Neste caso, o eDNA foi útil no diagnóstico dos processos biogeoquímicos que ocorrem na área, além de, servir como uma ferramenta de projeção para identificar futuros impactos ambientais. Como já mencionado anteriormente, a eutrofização na área é pontual e de rápida ocorrência em áreas de influência marinha, desse modo, o eDNA se retirado no momento em que está ocorrendo o processo, pode ajudar a prever micro-organismos ligados a estes distúrbios. A plataforma MinION, utilizada nesse estudo, se mostrou útil para a análise em questão, sendo capaz de sequenciar diferentes espécies de micro-organismo e sua frequência. Recomenda-se melhores estudos afim de identificar melhor a ecologia e os processos biológicos no local, já que estes resultados são preliminares, resultantes de teste metodológicos, e demonstram resultados promissores.

Palavras-chave: Desequilíbrio ambiental; eDNA; Bacteriplâncton

ASHTON, Philip M et al. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 296-300, 8 dez. 2014.

CAI, Haiyuan et al. Sandarakinorhabdus cyanobacteriorum sp. nov., a novel bacterium isolated from cyanobacterial aggregates in a eutrophic lake. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 730-735, 1 mar. 2018.

FUHRMAN, Jed A. Microbial community structure and its functional implications. **Nature**, [S.L.], v. 459, n. 7244, p. 193-199, maio 2009.

KEKUEWA, Samuel A. H. et al. Seasonal nearshore ocean acidification and deoxygenation in the Southern California Bight. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 12, n. 1, 26 out. 2022.

KOBIYAMA, Atsushi et al. Seasonal and annual changes in the microbial communities of Ofunato Bay, Japan, based on metagenomics. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, 26 ago. 2021.

LIU, Renju et al. *Croceimicrobium hydrocarbonivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium isolated from a bacterial consortium that degrades polyethylene terephthalate. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 4, 13 abr. 2021.

SCHOFFELEN, Jan-Mathijs et al. A 204-subject multimodal neuroimaging dataset to study language processing. **Scientific Data**, [S.L.], v. 6, n. 1, 3 abr. 2019.

TERAMOTO, Maki et al. *Oleibacter marinus* gen. nov., sp. nov., a bacterium that



degrades petroleum aliphatic hydrocarbons in a tropical marine environment. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 61, n. 2, p. 375-380, 1 fev. 2011.

WU, Dong-Mei *et al.* Comparison of bacterial community structure and potential functions in hypoxic and non-hypoxic zones of the Changjiang Estuary. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. e0217431, 6 jun. 2019.

YANG, Qiao *et al.* Sulfitobacter alexandrii sp. nov., a new microalgae growth-promoting bacterium with exopolysaccharides bioflocculating potential isolated from marine phycosphere. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 114, n. 7, p. 1091-1106, 24 abr. 2021.

ZAMORA-TEROL, Sara; NOVOTNY, Andreas; WINDER, Monika. Reconstructing marine plankton food web interactions using DNA metabarcoding. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 29, n. 17, p. 3380-3395, 9 ago. 2020.

Apoio: FAPESC