

## **Análise metataxonômica de bactérias degradadoras de combustível diesel obtidas do rio Juruá, AM.**

Santos, Samára Ferreira<sup>1</sup>; Sousa, Thiago Fernandes<sup>2</sup>; Queiroz, Claudia Afras de<sup>3</sup>; Yamagishi, Michel Eduardo Beleza<sup>4</sup>; Silva, Gilvan Ferreira da<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Amazônia Ocidental; <sup>2</sup>Universidade Federal do Amazonas; <sup>3</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; <sup>4</sup>Embrapa Agricultura Digital.

Emails: samara.bagging@gmail.com; thiago.f.sousa@ufv.br

### **Resumo**

A extensiva utilização de derivados de petróleo tem sido a principal causa de poluição por hidrocarbonetos, pois são de difícil degradação no meio ambiente. Derivados como o diesel, são tóxicos e letais para a maioria dos organismos vivos e a contaminação do solo e água por este composto, tem consequências danosas ao ambiente e a saúde humana. Muitos métodos físicos e químicos têm sido desenvolvidos para remoção desses compostos, no entanto são muito dispendiosos e ecologicamente não sustentáveis. Nesse sentido, microrganismos surgem como uma alternativa para biorremediação pois são capazes de utilizar esses hidrocarbonetos de cadeia longa como fonte de energia ou produzir biossurfactantes que solubilizam esses componentes. Neste estudo, foi usada a água do rio Juruá para uma seleção positiva de bactérias com habilidade para degradação de diesel. O *pool* de bactérias capazes de utilizar diesel como única fonte de carbono foi usado para obtenção do metagenoma aqui avaliado quanto a composição de espécies. A análise metataxonômica permitiu a identificação de fragmentos de DNA principalmente relacionados ao gênero *Burkholderia* permitindo a identificação de quatro espécies (*B. lata*, *B. contaminans*, *B. cenocepacia* e *B. cepacia*), também foram identificados fragmentos de *Dyella japonica*, *Dyella* sp. e *Cupriavidus* sp. Os resultados indicam o potencial dessas espécies na degradação do diesel. Ao nosso conhecimento este é o primeiro relato de *Dyella* sp. para degradação de diesel apesar do gênero já ser descrito como degradador de outros hidrocarbonetos aromáticos. Espécies de *Cupriavidus* e *Burkholderia* são bem reconhecidos pela degradação desses compostos e são uma alternativa ambientalmente sustentável para a remediação de hidrocarbonetos.

**Palavras-Chave:** Biorremediação; BGCs; Taxonomia

### **Introdução**

Os crescentes problemas de poluição do solo têm causado preocupações em todo o mundo. Um grande número de contaminantes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), petróleo e produtos relacionados, pesticidas, clorofenóis e metais pesados entram no solo, representando uma enorme ameaça à saúde humana e ao ecossistema natural (Chen et al. 2015).

Os derivados de petróleo apresentam cadeias complexas e longas de hidrocarbonetos que são usados como fonte de energia e estão associados a diversas atividades humanas, gerando dependência do seu uso. A liberação acidental de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos e terrestres pela indústria petroquímica, vazamentos de transportes fluviais é de grande preocupação por causa da toxicidade e carcinogenicidade dos produtos petrolíferos, tendo grande impacto nas mudanças de ecossistema (Loganathan et al. 2020). A remediação de acidentes envolvendo derivados de petróleo é difícil, e os métodos físicos e químicos disponíveis são de alto custo e não são ecologicamente sustentáveis (Riser-Roberts 2020).

Sob condições favoráveis, foi relatado que micróbios usam pesticidas como fonte de carbono, enxofre e doadores de elétrons. micróbios; bactérias, actinomicetos e fungos ajudam a remover ou desintoxicar pesticidas clorados; difenil policlorado, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, organofosforado. Na literatura, os principais gêneros bacterianos relacionados a biodegradação de compostos tóxicos são: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxalla*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Paracoccus*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia* e *Sphingomonas* (Parte et al. 2017).

A biorremediação é uma abordagem alternativa para remover hidrocarbonetos que são liberados no meio ambiente. Neste processo, bactérias são usadas para degradar os componentes tóxicos como derivados de petróleo, pesticidas entre outros (Moliterni et al. 2012; Malik et al. 2023). As bactérias são selecionadas por sua capacidade de metabolizar compostos orgânicos e usar a fonte de carbono para obtenção de energia e manutenção das suas atividades essenciais (Patil et al. 2012). Bactérias também podem produzir metabólitos secundários conhecidos como biossurfactantes nos quais solubilizam esses hidrocarbonetos de cadeia longa (Ng et al. 2022). Enzimas como alcano hidroxilases, monooxigenases e P450 oxigenases são descritas como atuantes no processo de degradação, nos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus* (Balseiro-Romero et al. 2017).

Nesse sentido, a descoberta de microrganismos que contenham enzimas e vias metabólicas de interesse para biodegradação é de grande interesse biotecnológico (Kachienga et al. 2018). O uso de metagenoma de ambientes ricos em hidrocarbonetos tem sido uma abordagem usada para identificar genes,

enzimas e táxons envolvidos na degradação de derivados de petróleo (Sierra-Garcia et al. 2014). Essa abordagem auxilia na engenharia genética e melhoria de linhagens, na descoberta de novas vias e espécies que podem ser usadas no processo de biorremediação para mitigar os impactos antrópicos (Liu et al. 2019).

O objetivo desta pesquisa foi estudar a biodiversidade microbiana amazônica como fonte para prospecção de táxons com habilidade para degradação de hidrocarbonetos usando uma abordagem metagenômica para identificação taxonômica de microrganismos utilizando o diesel como única fonte de carbono.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção de metagenomas de bactérias crescidas em meio seletivo para degradação de hidrocarbonetos**

A seleção foi realizada a partir de 1 mL de água coletada no rio Juruá, adicionada em 299 mL de meio mínimo líquido BH (Bushnell Haas) contendo 1% de diesel. A mistura foi colocada para crescer durante 3 dias a 28°C. Após esse período o conteúdo foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante contendo o meio de cultivo foi descartado e parte do *pellet* foi armazenado em -80°C e a outra parte foi usada para extração de material genético. O DNA metagenômico foi preparado com PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™ by Thermo) e quantificado em Fluorômetro Qubit™ 2.0 utilizando o kit dsDNA BR Assay (Invitrogen™ by Thermo). O sequenciamento foi realizado pela plataforma Illumina usando com read length: 2 x 150 (Paired End). A montagem dos metagenomas foi realizada utilizando o SPAdes (Prjibelski et al. 2020).

O acesso ao patrimônio genético foi realizado de acordo com a solicitação SISGEN cadastro de Acesso No AB6B14F.

### **Análise metataxonômica**

O metagenoma sequenciado neste trabalho, foi submetido a análise taxonômica com auxílio da plataforma Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC - <https://www.bv-brc.org/>) para identificação dos táxons presentes no metagenoma.

## Resultados e Discussão

A análise do metagenoma permitiu a identificação de 7826 fragmentos de DNA pertencentes a espécies de *Burkholderia*, dos quais 4125 puderam ser relacionadas com *B. cepacia*, 764 com *B. lata*, 2807 com *B. contaminans* e 130 com *B. cenocepacia*. Os fragmentos de DNA pertencentes ao gênero *Burkholderia* representaram 77% dos fragmentos totais da amostra (Figura 1 e 2). Também foram identificados 130 contigs relacionados ao gênero *Cupriavidus* que correspondem a 1% da amostra total, 558 contigs (5%) relacionados a espécie *Dyella japonica* e 517 contigs (5%) relacionados a *Dyella* sp. (Figura 1).

O gênero *Burkholderia* tem distribuição cosmopolita, ocupa diferentes nichos como plantas, solos, animais e é reconhecido pela produção de enzimas de importância industrial, metabólitos bioativos, bioremediação e aplicação na agricultura (Vial et al. 2007; Back et al. 2022). Algumas espécies de *Burkholderia* podem ser agentes causais de doenças em plantas, animais e humanos, por esse motivo, a expressão heteróloga de genes com aplicação biotecnológica em hospedeiros seguros vêm sendo uma alternativa para explorar o potencial do gênero na produção de moléculas ou na melhoria de linhagens aplicadas à promoção de crescimento e controle de fitopatógenos (Adaikpoh et al. 2022; Petrova et al. 2022).

Bactérias pertencentes ao gênero *Dyella* têm sido estudadas como bioremediadores devido ao seu potencial na degradação de bifenil no qual é constituinte de muitos poluentes como petróleo, corantes e solventes (Li et al. 2009). Por outro lado, o gênero *Cupriavidus* auxilia na biorremediação de metais pesados como o mercúrio (Rojas et al. 2011; Bravos et al. 2020).

A identificação de fragmentos de DNA de *Burkholderia*, *Dyella* e *Cupriavidus* pode auxiliar na criação de produtos e processos voltados à agricultura e bioeremediação de ambientes contaminados.

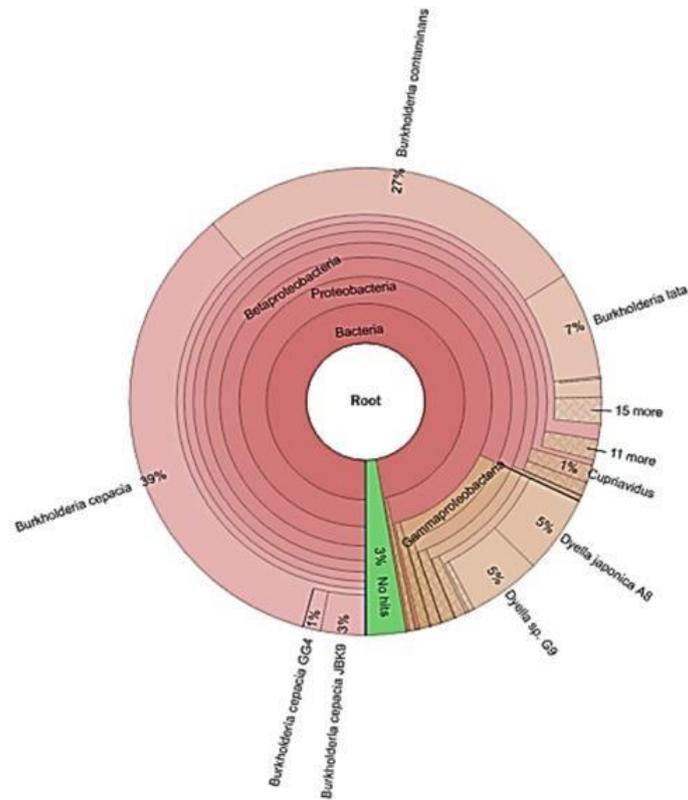


Figura 1. Linhagens bacterianas encontradas na mineração gênica.

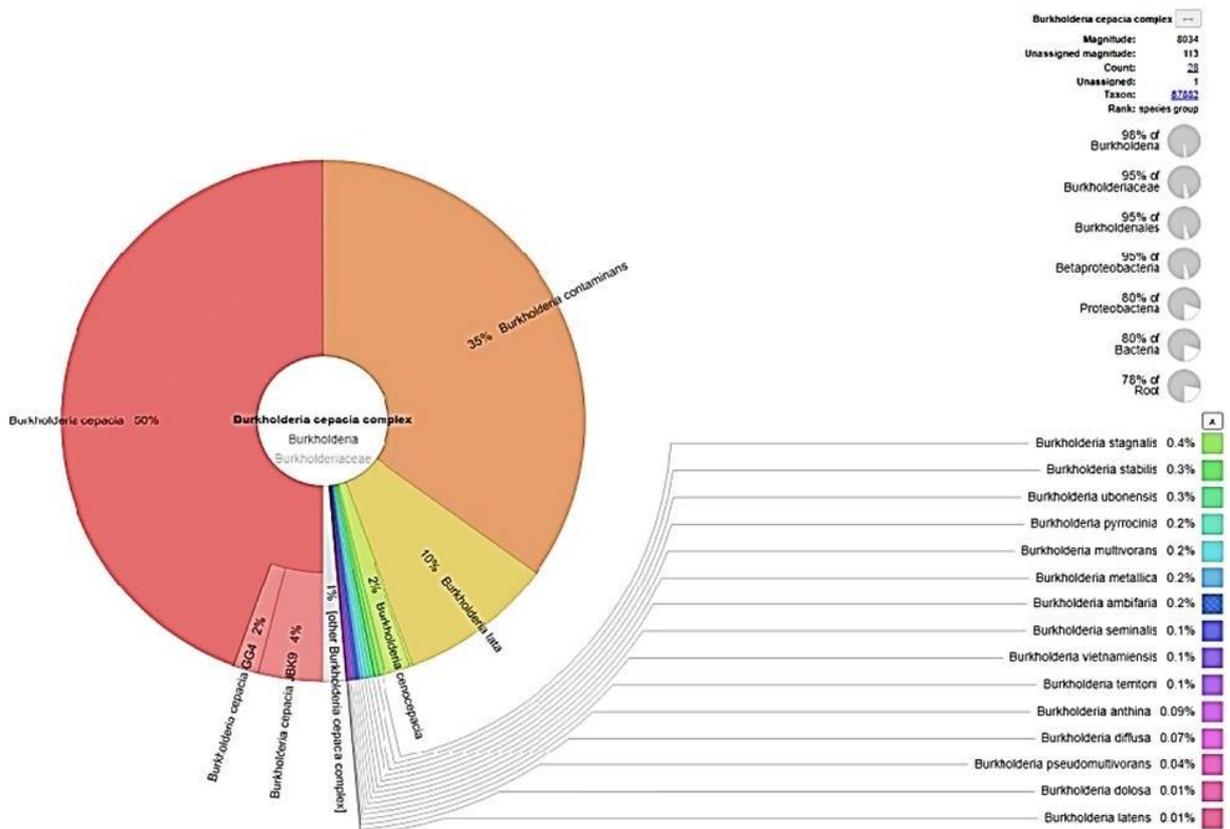


Figura 2. Linhagens de *Burkholderia* sp. encontradas na mineração gênica.

A identificação metagenômica de genes, agrupamentos gênicos como operon para degradação de compostos tóxicos e cluster gênicos biossintéticos relacionados ao metabolismo secundário de *Burkholderia*, *Dyella* e *Cupriavidus* pode auxiliar na criação de novos produtos e processos voltados à biorremediação de ambientes contaminados, bem como na prospecção de moléculas de interesse biotecnológico.

O gênero *Burkholderia* é reconhecido pela produção de enzimas de importância industrial, metabólitos bioativos, biorremediação e aplicação na agricultura. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro relato que o gênero *Dyella* é estudado como biorremediadores devido ao seu potencial na degradação de diesel, apesar do gênero já ser descrito como degradador de outros hidrocarbonetos aromáticos. Por fim, o gênero *Cupriavidus* auxilia na biorremediação de metais pesados como o mercúrio. Diante dessa realidade, microrganismos surgem como uma alternativa para biorremediação pois são capazes de utilizar esses hidrocarbonetos de cadeia longa como fonte de energia ou produzir biossurfactantes que solubilizam esses componentes.

### **Conclusões**

A abordagem metagenômica utilizada para sequenciamento de microrganismos com habilidade de degradação de hidrocarbonetos selecionados a partir da diversidade microbiana do bioma Amazônico permitiu a seleção de consórcio contendo 77% das espécies de *Burkholderia cepacia*, *B. lata*, *B. contaminans* e *B. cenocepacia*. Também foram identificadas sequências de DNA relacionados ao gênero *Cupriavidus* e *Dyella*.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelo suporte financeiro e concessão de Bolsas de estudo obtido a partir do programa Biodiversa (Edital Nº 007/2021). Ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES-Procad AmazonMicro e CAPES-Amazônia Legal.

## Referências

- Adaikpoh, B.I.; Fernandez, H.N.; Eustáquio, A.S. 2022. Biotechnology approaches for natural product discovery, engineering, and production based on *Burkholderia bacteria*. *Current Opinion in Biotechnology* 77: 102782.
- Balseiro-Romero, M.; Gkorezis, P.; Kidd, P.S.; Hamme, J.V.; Weyens, N.; Monterroso, C.; Vangronsveld, J. 2017. Characterization and degradation potential of diesel-degrading bacterial strains for application in bioremediation. *International journal of phytoremediation* 19(10): 955-963.
- Bravo, G.; Vega-Celedón, P.; Gentina, J.C.; Seeger, M. 2020. Effects of mercury II on *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 during mercury bioremediation under aerobic and anaerobic conditions. *Processes* 8(8): 893.
- Chen, M.; Xu, P.; Zeng, G.; Yang, C.; Huang, D.; Zhang, J. 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology advances* 33(6): 745-755.
- Ghandi, M.; Chikindas, M.L. 2007. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113(1,1): 1-15.
- Ghssein, G.; Ezzeddine, Z. 2022. A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: Pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology* 11(12): 1711.
- Grobelak, A.; Kokot, P.; Hutchison, D.; Grosser, A.; Kacprzak, M. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria as an alternative to mineral fertilizers in assisted bioremediation - Sustainable land and waste management. *Journal of Environmental Management* 227: 1-9.
- Jones, A.M.; Dodd, M.E.; Webb, A.K. 2001. *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. *The European Respiratory Journal* 17(2): 295-301.
- Joutey, N.T.; Bahafid, W.; Sayel, H.; Ghachtouli, N.E. 2013. Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. *Biodegradation-life of science* 1: 289-320.
- Kachienga, L.; Jitendra, K.; Momba, M. 2018. Metagenomic profiling for assessing microbial diversity and microbial adaptation to degradation of hydrocarbons in two South African petroleum-contaminated water aquifers. *Scientific Reports* 8.1: 7564.
- Lawson, P.A. 2018. Chapter 1 - The Phylum Actinobacteria. In: Mattarelli, P.; Biavati, B.; Holzappel, W.H.; Wood, B.J.B. *The Bifidobacteria and Related Organisms*. Academic Press Elsevier Inc. p.1-8.
- Li, A.; Qu, Y.; Zhou, J.; Ma, F. 2009. Characterization of a newly isolated biphenyl-degrading bacterium, *Dyella ginsengisoli* LA-4. *Applied biochemistry and biotechnology* 159(3): 687-695.

Liu, L.; Bilal, M.; Duan, X.; Iqbal, H.M.N. 2019. Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria-current challenges and future perspectives. *Science of The Total Environment* 667: 444-454.

Loganathan, B.G.; Ahuja, S.; Subedi, B. 2020. Synthetic organic chemical pollutants in water: origin, distribution, and implications for human exposure and health. In: Auja, S.; Loganathan, B.G. (ed). *Contaminants in our water: identification and remediation methods*. American Chemical Society 1352: 13-39.

Mahenthalingam, E.; Urban, T.A.; Goldberg, J.B. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology* 3(2): 144-56.

Mahé, B.; Masclaux, C.; Rauscher, L.; Enard, C.; Expert, D.1995. Differential expression of two siderophore dependent iron acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family. *Molecular microbiology* 18(1): 33-43.

Malik, S.; Kishore, S.; Kumar, S.A.; Dhasmana, A. 2023. Role of bacteria in biological removal of environmental pollutants. In: Shah, M.P.; Vyas, B.R.M. *Emerging Technologies in Applied and Environmental Microbiology*. Academic Press. p.205-225.

Meij, A.V.D.; Worsley, S.F.; Hutchings, M.I.; Wezel, G.P.V. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 41(3): 392-416.

Moliterni, E.; Jiménez-Tusset, R.G.; Villar Rayo, M.; Rodriguez, L.; Fernández, F.J.; Villasenor, J. 2012. Kinetics of biodegradation of diesel fuel by enriched microbial consortia from polluted soils. *International Journal of Environmental Science and Technology* 9: 749-758.

Ng, Y.J.; Lim, H. R.; Khoo, K. S.; Chew, K.W.; Chan, D.J.C.; Bilal, M.; et al. 2022. Recent advances of biosurfactant for waste and pollution bioremediation: Substitutions of petroleum-based surfactants. *Environmental Research* 212: 113126.

Pawar, S.; Chaudhari, A.; Prabha, R.; Shukla, R.; Singh, D.P. 2019. Microbial pyrrolnitrin: Natural metabolite with immense practical utility. *Biomolecules* 9(9): 443.

Patil, T.D.; Pawar, S.; Kamble, P.N.; Thakare, S.V. 2012. Bioremediation of complex hydrocarbons using microbial consortium isolated from diesel oil polluted soil. *Der Chemica Sinica* 3(4): 953-958.

Parte, S.G.; Mohekar, A.D.; Kharat, A.S. 2017. Microbial degradation of pesticide: a review. *African journal of microbiology research* 11(24): 992-1012.

Petrova, Y.D.; Zhao, J.; Webster, G.; Mullins, A.J.; Williams, K.; Alswat, A.S.; Mahenthalingam, E. 2022. Cloning and expression of *Burkholderia polygyne*

biosynthetic gene clusters in *Paraburkholderia* hosts provides a strategy for biopesticide development. *Microbial biotechnology* 15(10): 2547-2561.

Riser-Roberts, E. 2020. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. Publishing CRC Press. 580p.

Rojas, L.A.; Yáñez, C.; González, M.; Lobos, S.; Smalla, K.; Seeger, M. 2011. Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation. *PloS one* 6(3): e17555.

Salwan, R.; Sharma, V.; Sharma, A.; Singh, A. 2020. Molecular imprints of plant beneficial *Streptomyces* sp. AC30 and AC40 reveal differential capabilities and strategies to counter environmental stresses. *Microbiological Research* 235: 126449.

Sierra-Garcia, I.N.; Alvarez, J.C.; de Vasconcellos, S.P.; de Souza, A.P.; dos Santos Neto, E.V.; de Oliveira, V.M.; 2014. New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian petroleum reservoirs. *PloS one* 9(2): e 90087.

Smith, M.A.; Trowers, N.R.; Klein, R.S.; 1985. Cervical osteomyelitis caused by *Pseudomonas cepacia* in an intravenous-drug abuser. *Journal of Clinical Microbiology* 21: 445-6.

Tabassum, H.; Guo, W.; Meng, W.; Mahmood, A.; Zhao, R.; Wang, Q.; Zou, R. 2017. Metal-organic frameworks derived cobalt phosphide architecture encapsulated into b/n co-doped graphene nanotubes for all pH value electrochemical hydrogen evolution. *Advanced Science News* 1-7.

Vial, L.; Groleau, M.C.; Dekimpe, V.; Deziel, E. 2007. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(9): 1407-1429.