

XII-026 - AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES EM UM SOLO CONTAMINADO EM UMA BIOPILHA

Valéria Boettcher⁽¹⁾

Acadêmica do curso de Engenharia Ambiental na Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Bolsista PIBITI (CNPq).

Diosnel Antonio Rodriguez Lopez

Engenheiro de Minas pela UFOP. Mestre em Metalurgia Extrativa pela UFRGS. Doutor em Engenharia pela TU-Berling. Professor do Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental (PPGTA) – Mestrado, UNISC.

Maria Viviane Gomes Muller

Bióloga. Mestre em Microbiologia pela UFRGS. Doutora pelo Departamento de Bioquímica da UFRGS. Professora e Pesquisadora nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Bioquímica, Fisiologia Humana e Microbiologia.

Ramiro Pereira Bisognin

Engenheiro Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Mestre em Tecnologia Ambiental na UNISC. Pós Graduando em Engenharia de Segurança do Trabalho na UNISC.

Endereço⁽¹⁾: Rua Osvaldo Cruz ,850 - Higienópolis – Santa Cruz do Sul - RS - CEP: 9682074-2 - Brasil - Tel: (51) 97017001 - e-mail: valeriaboettcher@gmail.com

RESUMO

A biorremediação de ambientes poluídos por contaminantes orgânicos vem alcançando importância mundial uma vez que possui vantagens econômicas e ambientais ao utilizar microrganismos com capacidades biodegradativas de rejeitos potencialmente tóxicos, como hidrocarbonetos derivados do petróleo. Sendo assim, os compostos do petróleo se tornaram alvo de observação e cuidado constante por serem um dos poluentes mais perigosos na atualidade. Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos são compostos orgânicos derivados do petróleo com diversas propriedades, capazes de causar sérios danos ao meio ambiente bem como a própria saúde humana. O presente trabalho tem por o objetivo isolar, identificar e avaliar a atividade biológica de microrganismos presentes em uma Biopilha utilizada para remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. Para a realização deste trabalho, amostras de solo foram retiradas da biopilha em nove pontos diferentes da mesma. As amostragens foram realizadas em três profundidades diferentes em cada ponto. Os ensaios de crescimento microbiológico foram realizados distintamente para cada profundidade e etapa de operação da biopilha, em três meios de cultivo. A caracterização dos microrganismos foi feita através de análises microbiológicas clássicas como teste de Gram e microcultivo. A diversidade genética das bactérias heterotróficas isoladas foi comprovada através do sequenciamento do gene RNAr 16S. As amostras submetidas ao PCR foram purificadas e enviadas para sequenciamento na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os microrganismos foram submetidos ao teste de biodegradação com a utilização do indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP) e teste de produção de biossurfactantes. Os resultados moleculares constataam a presença do gênero bacteriano *Bacillus sp.* dentre algumas das bactérias isoladas do solo. Alguns dos gêneros fúngicos encontrados foram *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Diplosporium sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Aspergillus sp.* dentre outros. No teste de biodegradação foi possível constatar que de 21 fungos, 8 apresentaram eficiência em degradar o óleo Diesel e das 80 bactérias, 31 tiveram um resultado satisfatório.

PALAVRAS-CHAVE: Biorremediação, Hidrocarbonetos, Identificação, PCR, Microcultivo.

INTRODUÇÃO

A contaminação dos solos é um fator preocupante no cenário mundial atual, sendo que a maioria resulta de derramamentos de compostos de hidrocarbonetos de petróleo em postos de distribuição de combustíveis. Esse problema pode não só residir no solo, mas em todo o ambiente da área afetada (solos, águas subterrâneas e superficiais, ar, fauna e vegetação), além de causar muitos danos à saúde humana.

Dentre as várias técnicas de tratamento do solo contaminado podemos citar a biorremediação, que consiste em utilizar microrganismos no processo remediador. As taxas de biorremediação dependem da atividade microbiológica do local, sendo assim todas as necessidades para a proliferação e vivência dos microrganismos devem ser equilibradas e controladas. A melhor opção para o aumento da taxa de biorremediação é a bioaumentação da atividade microbiológica. Esta consiste em favorecer o ambiente para o aumento do número de microrganismos. Isso é obtido através da adição de nutrientes, oxigênio (processo aeróbico), nitratos, sulfatos, dióxido de carbono, entre outros e associa-se o controle do pH, temperatura e umidade.

A avaliação e caracterização dos microrganismos presentes é um fator importante para o aumento do processo remediador, sendo que para cada tipo de solo contaminado, há uma série de microrganismos interligados, onde diferentes atividades microbianas podem ser favoráveis aos processos de remediação.

O presente relatório tem como foco avaliar a atividade microbiana de um solo em processo de biorremediação em uma biopilha, levando em consideração diferentes períodos e profundidades.

MATERIAIS E MÉTODOS

O solo avaliado no presente trabalho foi coletado de uma biopilha utilizada para a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. As amostras retiradas desta célula de remediação foram coletadas em 9 pontos diferentes e com distintas profundidades (50 cm, 95 cm e 140 cm). Outra amostra de solo foi retirada e enviada para a Central Analítica da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) para a contagem das Unidades formadoras de colônias de microrganismos. De cada amostra de solo, removidas de profundidades diferentes, foram retirados 10 g e dissolvidos em 90 mL de água peptona a 0,1 % para a obtenção da suspensão inicial.

Em seguida foram feitos três diferentes meios de cultivo, sendo eles: Agar Sabouraud, Agar Nutriente e Agar Caseinato para o crescimento de fungos, bactérias heterotróficas e actinomicetos. Nesses três meios de cultivo foram aplicadas diluições da suspensão inicial (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). O processo foi feito em triplicata com a utilização da alça de Drigalski para o espalhamento na placa, o que resultou em um total de quinze placas para cada meio de cultivo. Os materiais com agar Caseinato e agar Nutriente foram armazenados em uma estufa a uma temperatura de 33°C a 37°C durante 7 dias. Já as placas contendo o meio de cultivo Sabouraud foram armazenadas em um recipiente plástico com temperatura ambiente (26°C) durante o mesmo período.

Foi feita uma seleção macroscópica de diferentes colônias para serem isoladas. O isolamento foi feito pelo método de estriamento com a ajuda de uma alça de platina estéril onde a mesma entra em contato com a colônia do microrganismo e desenha estrias no meio de cultivo. As colônias isoladas foram armazenadas assim como anteriormente e o processo de proliferação de fungos e bactérias variou de 7 a 15 dias. Após o período de proliferação, os microrganismos foram submetidos a um teste de biorremediação juntamente com a avaliação da produção de biossurfactantes.

O teste de biorremediação consistiu em avaliar durante 92 horas a degradação de um corante 2,6 Diclorofenol – Indofenol (DCPIP) em uma solução contendo meio BH (Bushnell Haas) com $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ de cada microrganismo e a presença de óleo Diesel como contaminante. Foram feitos 10 campanhas de testes sendo que o valor final de microrganismos isolados foi de 21 fungos e 80 bactérias.

A avaliação de produção de biossurfactantes foi feita com a observação de redução da tensão superficial, para isso foi aplicado um método conhecido como peso da gota.

Para a caracterização desses foram utilizados métodos de identificação biológicos. A Figura 1 a seguir demonstra os métodos utilizados.

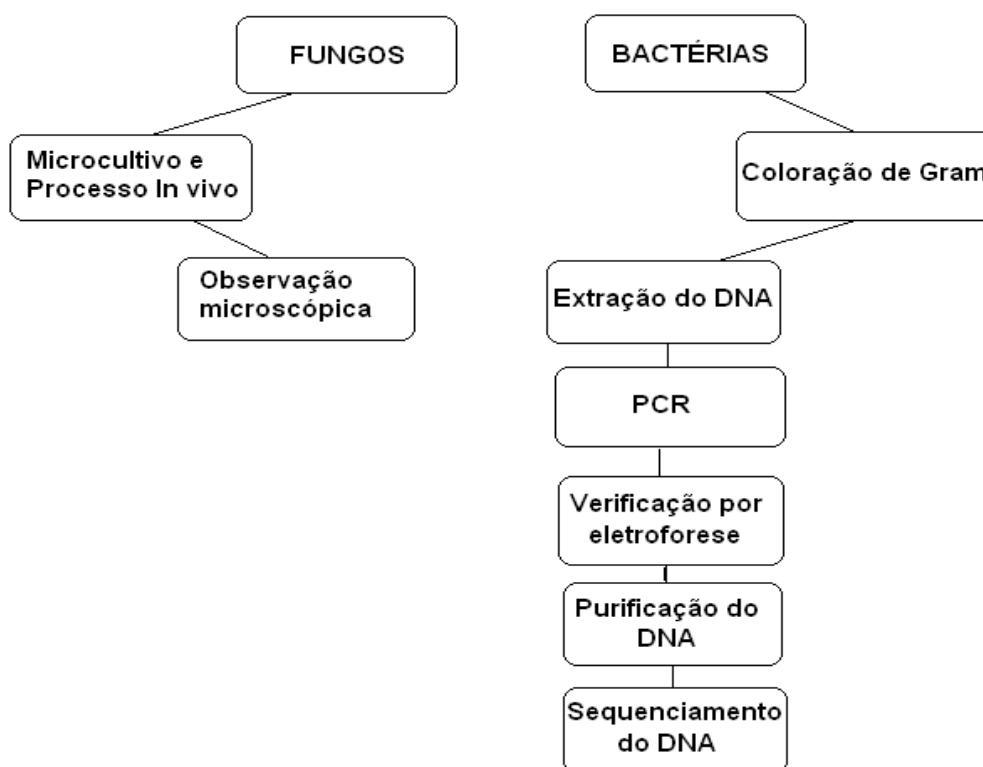


Figura 01 - Processos de identificação microbiológica presentes no trabalho.

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Coloração de gram

Para as bactérias, a identificação foi iniciada aplicando a técnica de Gram que consistiu na aplicação de corantes (Cristal Violeta, Lugol e Fucsina) sobre um esfregaço de colônia em uma lâmina. A cada aplicação de corante foi estipulado um tempo de permanência do mesmo e em seguida a lâmina foi lavada com água deionizada juntamente ao álcool. Por fim, as lâminas foram aplicadas em um microscópio com ampliação máxima (100x) e as colônias foram avaliadas conforme o seu gram resultante.

Extração do DNA bacteriano

Em seguida foi feita a extração do DNA bacteriano no qual foram colocados 50 µL da amostra de uma cepa em 6 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) em um eppendorf. Em seguida, a solução resultante foi colocada em um banho-maria a 37°C por 24 horas.

Da solução mantida em banho-maria foram retirados 2mL para outro eppendorf, o qual foi centrifugado por cinco minutos a 13.000g. O sobrenadante da amostra centrifugada foi descartado e o restante foi ressuspenso em 100µL de água estéril.

Esta nova amostra foi mantida novamente em banho-maria por cinco minutos a uma temperatura de 100 °C.

Posteriormente, a amostra foi centrifugada com os mesmos ajustes anteriores e o sobrenadante foi pipetado para um novo eppendorf, sendo que o restante foi inutilizado. O sobrenadante no eppendorf foi mantido em um refrigerador até o processo PCR ser feito.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

A PCR (Polymerase Chain Reaction) foi iniciada com o ajuste da concentração de DNA obtidos no método de extração do mesmo. Sendo a concentração de DNA de 50 ng/µL a 100 ng/µL não foi necessário o ajuste.

Entretanto todas as amostras sofreram medições das concentrações de DNA no aparelho Nano Drop Thermo Scientific (2000 C Spectrophotometer).

Nas amostras que apresentaram uma concentração de DNA acima do estipulado, usou-se uma fórmula para quantificar a diluição com solução de TE (10Mm Tris-HCL Ph 8,1 Mm Na₂EDTA) necessária. A partir do resultado da fórmula aplicada a cada amostra de DNA foi possível constatar a quantidade de DNA (em µL) necessária para uma nova amostra diluída. O valor de DNA de cada amostra foi subtraído com 30 µL (Volume final) e assim encontrado o volume de solução de TE que foi adicionado em cada uma das mesmas.

Com as diluições prontas, foi iniciado o processo de configuração da programação no Aparelho Termociclador Biocycler (Gradient Thermal Cycler). A configuração da programação no Termociclador foi feita conforme os dados abaixo:

Passo 1: Desnaturação Inicial 95°C - 5 minutos

Passo 2: Desnaturação 95°C - 50 segundos, Anelamento 55°C - 50 segundos e Extensão 72°C - 1 minuto.

Passo 3: Extensão Final 72°C - 5 minutos

O processo total e final resultou em 35 ciclos.

Em seguida foi preparado o Mix em uma capela estéril, sendo que todos os reagentes do mesmo foram adicionados a um eppendorf com suas respectivas quantidades assim como demonstra na Tabela 01:

Tabela 01 - Reagentes para o Mix da PCR

Nome do reagente	Concentração Final em 25 µL	Volume (Em µL) em 1 microtubo
DNTPs	0,2 Mm	2,5 µL
Tampão da reação (NH ₄)SO ₄ -MgCl ₂	1x	2,5 µL
Mg Cl ₂	1,5Mm	1,5 µL
Primer 1 (16sf)	0,4Pm	1 µL
Primer 2 (16sr)	0,4Pm	1 µL
TAq	1U	0,2 µL
Água de Milli-Q		15,3 µL
Amostra de DNA	50-100 ng/ µL	1 µL
TOTAL		25 µL

Sabendo as respectivas quantidades e as concentrações, o mix foi feito conforme a quantidade de amostras que sofreriam a PCR. Sendo assim, a cada 10 amostras feitas, a quantidade do reagente era multiplicada ao número de amostras mais o controle negativo, resultando 11 amostras.

O mix pronto foi adicionado a cada eppendorf em uma quantidade de 24 µL. Subsequentemente, fora da capela foi adicionado 1 µL de DNA de cada amostra, sendo que o controle negativo ficou isento do mesmo. Ao final, foram totalizados os 25 µL em cada eppendorf, sendo que estes foram identificado na tampa com o n° do microrganismo isolado.

Em seguida, as amostras contendo o Mix + DNA juntamente com o Controle Negativo foram colocadas no Aparelho Termociclador e dado início a programação configurada anteriormente, com o total de 35 ciclos. A duração da PCR foi de duas horas e trinta minutos. Obs: Segundo CEBRÓN *et al.*, (2008) foram utilizados dois primers para a PCR, sendo que cada um possuía uma seqüência genética. Na Figura 02 a seguir as seqüências com seus nomes podem ser vistos.

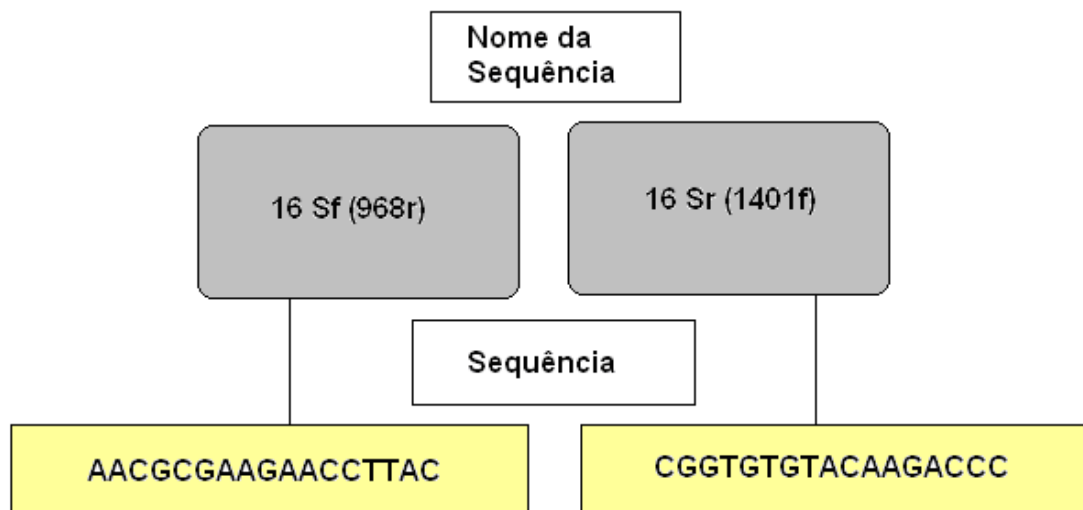


Figura 02 - Nome dado aos Primers e suas respectivas seqüência genéticas.

Fonte: CÉBRON, 2008.

Eletroforese em gel de agarose

Prosseguindo o processo de PCR, a verificação da reação foi feita por meio de eletroforese em gel. Para isso, foi necessário preparar o meio de suporte das amostras sendo que o mesmo foi um gel de agarose (1%).

Foram pesados 0,60 g de agarose em pó e adicionado a 60 mL de Solução-Tampão (TBE). Essa solução foi aquecida, até o início da fervura e em seguida foi deixada em repouso até um leve resfriamento da mesma. Logo em seguida, foram adicionados 3 µL de Brometo de Etídeo.

A solução resultante foi colocada em um molde contendo fitas nas laterais, juntamente com 2 pentes. Após 25 minutos foi possível retirar o gel solidificado da forma juntamente com os pentes, os quais formaram poços. O gel foi colocado dentro de uma plataforma de eletroforese, sendo que a mesma foi cheia com uma quantidade de TBE (1x) necessária para cobrir todos os poços do meio de suporte. Sobre cada um desses poços foi aplicado com um pipetador uma ressuspensão de 5 µL de amostra de DNA que sofreu PCR juntamente com 2 µL de solução tampão contendo 0,25% de azul de Bromofenol+ 0,25% de xilenocianol+30% de glicerol. Sobre a plataforma de eletroforese o meio de suporte permaneceu durante 1 hora a 75 V.

Após o período estipulado, o gel no qual sofreu eletroforese foi colocado em um Transiluminador de luz UV (Vibber Lourmat) para a verificação das bandas de DNA, assim como a Figura 03 demonstra:

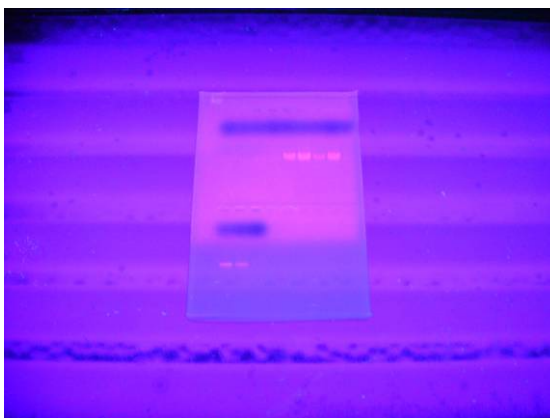


Figura 03- Bandas de DNA no gel visíveis a luz UV
Fonte: Registro do autor, 2011.

Purificação do DNA

Cada uma das bandas de DNA no gel foi cortada em um fragmento cúbico com ajuda de um bisturi e aplicada em eppendorf, ao qual foi pesado antes da aplicação e após. Com os pesos anteriores ao gel e posterior a colocação do mesmo no eppendorf foi possível calcular a massa de cada gel contendo DNA. Com os valores da massa do gel aplicada no eppendorf foi possível fazer a relação da quantidade de Binding Buffer II (400 μ L/100 mg de gel), que foi adicionada posteriormente em cada um dos mesmos.

Todos os reagentes utilizados nessa etapa foram feitos com o Kit de purificação de DNA em bandas de gel LUDWIG BIOTEC (EZ-10 Spin Column). Posteriormente, as amostras foram colocadas no Shaker a 60° C por 10 minutos ou até o derretimento do gel. A solução líquida resultante foi vortexada e transferida a um tubo contendo uma coluna azul com filtro. Essa solução em tubo com coluna foi centrifugada por 2 minutos em 10.000 rpm.

Logo após, o material que ficou no tubo foi descartado e adicionado 500 μ L de Wash Solution no mesmo local, sendo que este foi novamente centrifugado com as mesmas configurações. Em seguida, a etapa anterior foi repetida para melhor lavagem do DNA e o material no tubo descartado.

A coluna com filtro sustentada por um tubo foi transferida para um eppendorf limpo de 1,5 mL e, no mesmo adicionado 40 μ L de Elution Buffer (pré aquecida à 60° C). Além disso, o eppendorf foi incubado em temperatura ambiente por 2 minutos, previamente a uma centrifugação a 10.000 rpm, por outros 2 minutos. Esta etapa foi repetida e o produto não foi descartado.

Sequenciamento do DNA

Após a purificação, as amostras foram enviadas para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS para seqüenciamento do DNA. Para isso, 6 mL de cada amostra purificada foi colocado em eppendorf e levando em relevância a concentração das mesmas no qual deveria estar entre 30- 60 ng/mL. Juntamente com as amostras, foi enviada uma quantidade de primer (16sf) no qual a seqüência foi vista anteriormente, sendo que a sua concentração deveria estar em 4,5 picoM.

IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA

Microcultivo

Com os fungos foi realizado um processo chamado de microcultivo, o qual é usado para identificar estruturas reprodutivas fúngicas. Nesse método o microrganismo é levado a se proliferar em uma de forma quadrada contendo agar e a lâmina. Esta forma quadrada de agar possuía medidas 1cm x 1cm, com uma espessura de aproximadamente 0,5 cm. O microcultivo foi iniciado posicionando um papel filtro no fundo de uma placa de Petri. Acima deste papel foi construída uma estrutura com palitos, os quais apoiavam uma lâmina. As placas usadas para microcultivo foram submetidas à esterilização na autoclave. Acima da lâmina foi colocado o fragmento de agar com as medidas citadas anteriormente. Na espessura do fragmento foi feito um esfregaço

com o microrganismo isolado, utilizando a alça de platina. Sobre esse fragmento foi depositada uma lamínula com o auxílio de uma pinça estéril.

As placas de microcultivo foram armazenadas a temperatura ambiente de 25°C por duas semanas e subsequentemente foi observado o crescimento na espessura do fragmento do agar, assim como a Figura 04 demonstra.

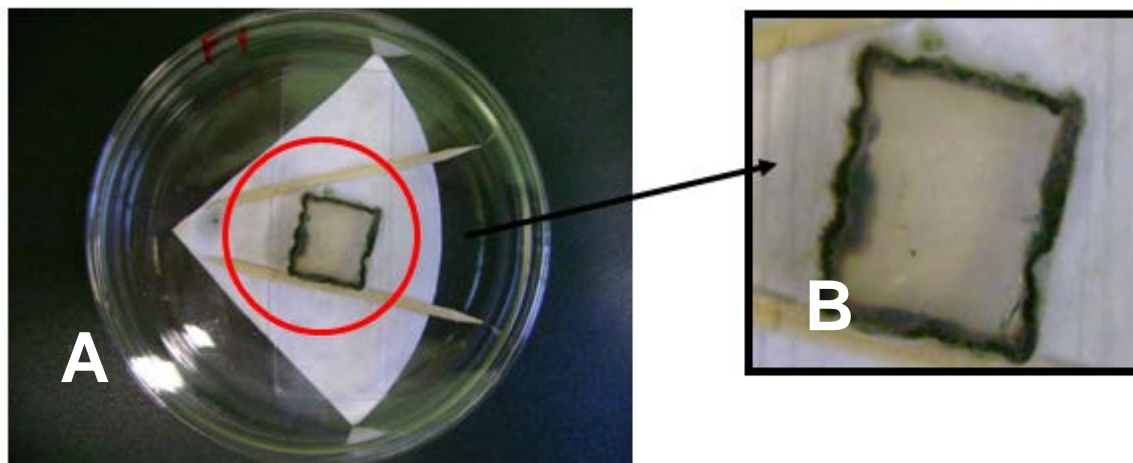


Figura 04 - Crescimento dos fungos por Microcultivo: A. No detalhe, crescimento dos fungos na espessura do agar :B.

Fonte: Registro do autor, 2011.

Com o crescimento dos fungos na espessura do fragmento foi possível utilizar tanto a lâmina quanto a lamínula que possuam contato ao meio de cultivo, bem como a avaliação em duplicata. Sendo assim, a lamínula da estrutura de microcultivo foi posicionada em uma lâmina estéril com uma gota da solução de Azul de Bromofenol, sendo que o corante ficasse abaixo da mesma. E na lâmina presente no microcultivo foi adicionada uma gota do mesmo corante bem com uma lamínula estéril resultando em amostras de cada fungo em duplicata. OBS: A composição do corante usado foi de 0,3 mL de Glicerol + 0,0025 g de Azul de bromofenol em pó + 1 mL de água estéril.

Subseqüentemente, com a ajuda de um microscópio com objetivas de 40x e 10x foi feita a identificação dos fungos, sendo que a estrutura reprodutiva de cada um foi encontrada e avaliada com ajuda do autor BARNETT *et al.*,1998.

Microcultivo in vivo

Para a confirmação dos resultados obtidos no método anterior, foi usado outro método mais simples de identificação nomeado Microcultivo IN VIVO. O método teve como iniciação o esfregão do fungo isolado durante duas semanas em lâmina. Foram adicionadas algumas gotas de Azul de Bromofenol sobre o fungo e acima aplicado uma lamínula.

Assim como o método anterior foi necessário o uso do microscópio com as mesmas configurações na objetiva de 40x e 10x para a identificação das estruturas fúngicas presentes na lâmina. Conforme a Figura 05 expressa, o fungo visto no microscópio.

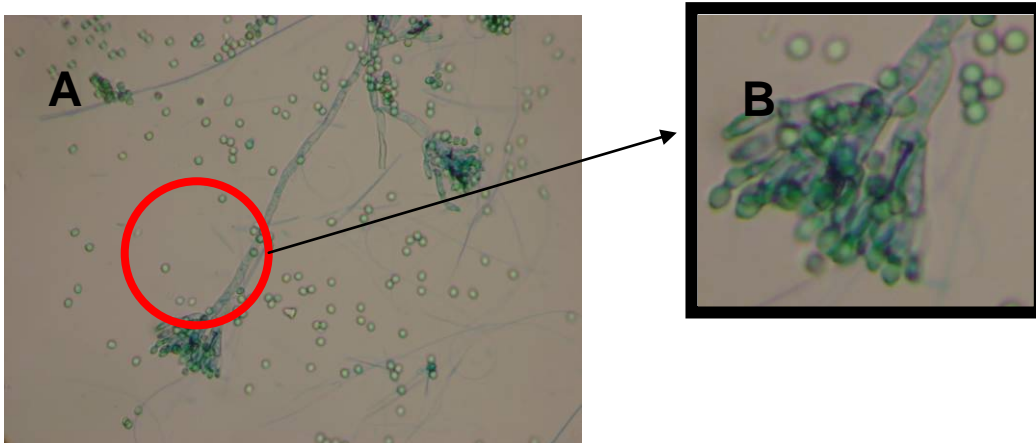


Figura 05 - Estrutura reprodutiva de um fungo (A). No detalhe, os esporângios contendo Esporos (B).
 Fonte: Registro do autor, 2011.

RESULTADOS OBTIDOS OU ESPERADOS

Unidades Formadoras de colônias

As Figuras 06 e 07 a seguir apresentam os resultados da contagem de unidades formadoras de colônias.

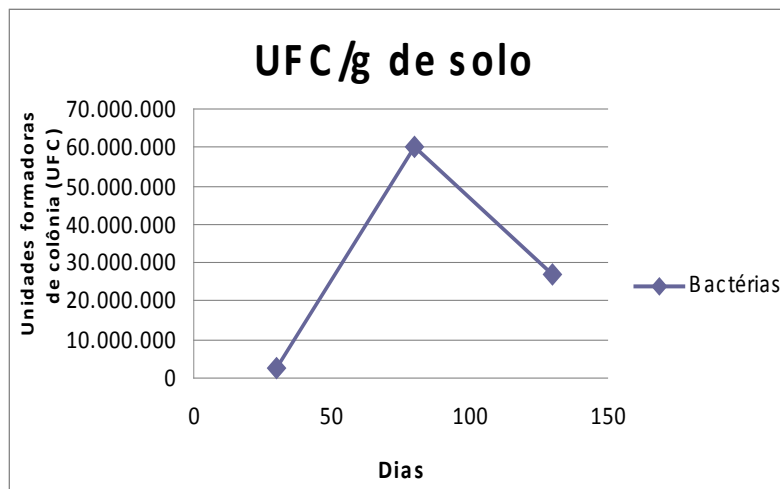


Figura 06-Unidades Formadoras de colônias de bactérias.

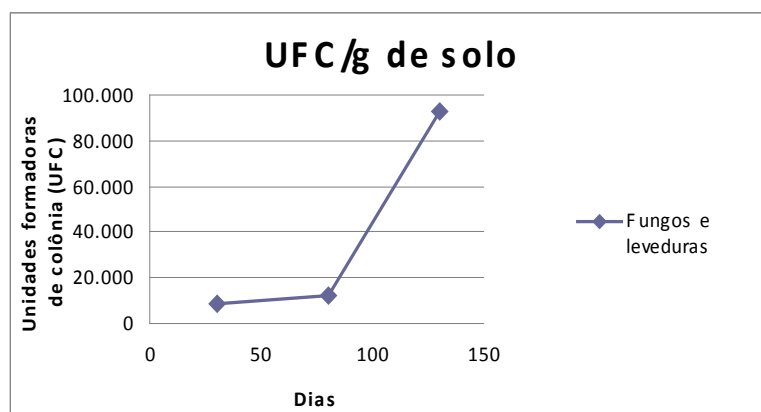


Figura 07-Unidades formadoras de colônias de fungos e leveduras.

O comportamento observado aqui das bactérias e dos fungos pode estar relacionado ao tipo de material utilizado pelos microorganismos como substrato. Na primeira parte dos testes, hidrocarbonetos de baixo peso molecular (maior solubilidade e maior biodisponibilidade) estão disponíveis para degradação. As bactérias utilizam estes compostos orgânicos como fonte de carbono, fazendo com isso que as mesmas aumentem seu número. Após a diminuição da concentração destes hidrocarbonetos de baixo PM, o número de bactérias diminui em função da pouca disponibilidade de substrato degradável por elas.

Com a redução da concentração dos hidrocarbonetos de baixo peso molecular, o substrato disponível se caracteriza por moléculas de hidrocarbonetos de elevado peso molecular. Estes compostos são degradados preferencialmente por fungos, cujo metabolismo está mais adaptado a compostos de peso moleculares elevados. Dessa forma, o número de fungos e leveduras aumenta a partir dos 80 dias de testes. Vaz (2010) observou o mesmo comportamento em uma biopilha utilizada para remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos.

Sequenciamento do DNA Bacteriológico

Das amostras enviadas para seqüenciamento na UFRGS, 15 delas possuíam o mesmo gênero bacteriológico.

Das 80 bactérias, 15 apresentaram a seqüência genética similar ao gênero *Bacillus sp.* e uma apresentou similaridade com *Streptomyces sp.* As demais amostras seguem com o processo de seqüenciamento, sendo que a identificação bacteriológica de no mínimo 1/3 das amostras obtidas deve ser relevante.

Identificação Fúngica

A identificação das espécies fúngicas, de acordo com suas características morfológicas, foi realizado com auxílio do livro de BARNETT *et al.*,1998. Os gêneros encontrados foram: *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Diplosporium sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Verticillium sp.* e *Cladosporium sp.* A Figura 08 abaixo ilustra a observação microscópica do fungo no qual foram aplicados métodos de microcultivo e In vivo.

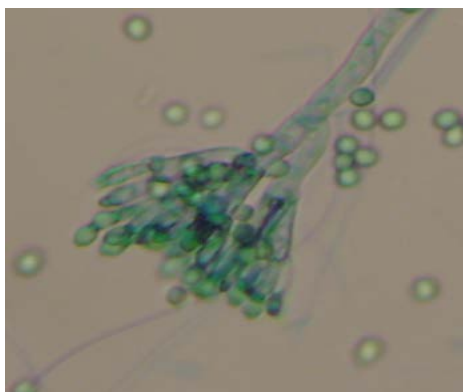


Figura 08- Estrutura reprodutiva de *Penicillium sp.*

Teste de biodegradação

Após as 92 horas das 10 campanhas de testes 40 microorganismos apresentaram degradação total do corante, 45 apresentaram degradação parcial e 16 apresentaram degradação ruim. Na Figura 09 a seguir é possível observar o início do teste e após as 92 horas.

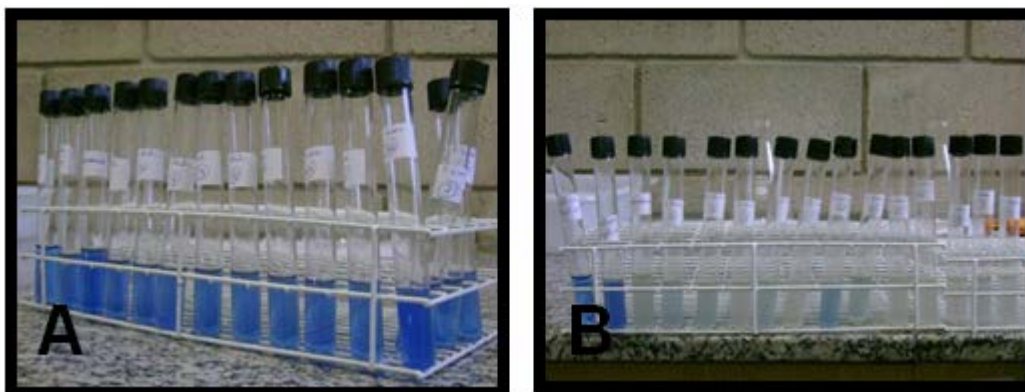


Figura 09 –Teste de Biodegradação. Etapas de avaliação do teste: A) 0 horas; B) 96 horas.

Os testes realizados com as amostras obtiveram consórcios e os mesmos apresentaram resultados muito satisfatórios em todas as campanhas de degradação.

Produção de Biossurfactantes

Após a constatação da tensão superficial antes e após o período de incubação foi possível observar que nenhum dos microrganismos foi capaz de produzir biossurfactante.

CONCLUSÕES/RECOMENDAÇÕES

Percebe-se que a presença de fungos e leveduras é muito menor que de bactérias, direcionando o foco para as mesmas.

Os resultados mostraram que a biorremediação do solo é realizado por um consórcio de microrganismos através de uma cooperação sinérgica entre eles. A presença do gênero *Bacillus sp.* entre as bactérias é relevante sendo de maior quantidade. O gênero fúngico com maior predominância foi *Trichoderma sp.*

A avaliação de produção de biossurfactante não foi satisfatória e recomenda-se futuramente alterar o método de medição da tensão superficial sendo que o mesmo não possui resultados esperados.

REFERÊNCIAS

1. VAZ, M.J., Biodegradação ex-situ e avaliação da atividade biológica de solos contaminados por hidrocarbonetos, 2010. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Santa Cruz do Sul, 2010.**
2. BARNETT, H. L.; HUNTER, B.B.; **Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Fourth Edition. 1998, 218 pg.**
3. CÉBRON, A. et al, 2008. **Real time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples.** Artigo publicado no Journal of Microbiological Methods -9 p. New York- NY.