

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PROVENIENTES DE ZONAS ESTUARINAS IMPACTADAS COM METAIS

Tâmara São Paulo Vidal; Rejane Rodrigues de Sousa*

Cristiane Correia Santos**

Resumo: A Baía de Todos os Santos – Recôncavo Baiano – tem sofrido diversos problemas ambientais devido ao crescimento urbano, às atividades turísticas e principalmente ao estabelecimento de indústrias. Os desequilíbrios na biota local, devido às alterações físicas e químicas nos manguezais, são principalmente causados por atividades petrolíferas nestes ambientes, originando a necessidade da remediação destes. Considerando a biodiversidade existente nas zonas estuarinas, é possível isolar e identificar microrganismos extremófilos que demonstram uma adaptação à vida nesses ambientes contendo metais. Com a finalidade de isolar estes microrganismos, foram coletadas amostras de sedimento e água nos manguezais do Recôncavo Baiano, em pontos de amostragem com diferentes graus de contaminação aparente. Em total foram 12 estações de amostragem. Coletaram-se no total, 17 amostras de água e 14 amostras de sedimento para isolamento dos microrganismos capazes de crescer na presença de Zinco (Zn), Magnésio (Mg), Manganês (Mn) ou Chumbo (Pb). As amostras coletadas foram enriquecidas em meio líquido YPD e posteriormente semeadas em meios de cultura seletivos, contendo uma das combinações de metais a seguir: Zn e Mg ou Pb e Mn. Após o crescimento microbiano a 30°C por no mínimo 48 horas, as colônias obtidas foram semeadas em meio YPDA para a obtenção das cepas de microrganismos puros. Desta forma, foram isoladas 16 cepas de microrganismos, sendo 12 cepas de bactérias e 4 cepas de fungos. Utilizando estes isolados, visa-se propor processos de recuperação das áreas impactadas, a partir do uso da biota nativa, através de processos de biorremediação.

Palavras-chave: Atividades petrolíferas; Manguezal; Biorremediação.

INTRODUÇÃO

A Baía de Todos os Santos, considerada como área núcleo da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, é a maior Baía do Brasil com 1.100 km² de extensão (GERMEN, 1995). A presença de poluentes em trechos da Baía de Todos os Santos tem ocasionado impactos ambientais que estão trazendo efeitos nocivos para a fauna e a flora local. Estudos químicos realizados constataram que a contaminação nos locais é ocasionada, principalmente, por hidrocarbonetos industriais, depositados na água e no solo pelas indústrias instaladas na região da baía (CORREIO DA BAHIA, 2001). A poluição dos mares e das zonas costeiras originadas por acidentes com o transporte marítimo de mercadorias, em particular o petróleo bruto, contribui, anualmente, em 10% para a poluição global dos oceanos. Todos os anos, 600.000 toneladas de petróleo bruto são derramadas em acidentes ou descargas ilegais, com graves conseqüências econômicas e ambientais (AMBIENTE BRASIL, 2000). Quando as marés negras atingem as zonas costeiras, os seus efeitos tornam-se ainda mais catastróficos. Além de destruir a fauna e a flora com elas em contato, provocam enormes prejuízos à atividade

* Acadêmicas do Curso de Ciências Biológicas, Bolsistas de Iniciação Científica (UCSal).

** Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Bolsista de Iniciação Científica (FAPESB/UCSal). Orientador: Juan Carlos Rossi Alva, Doutor em Bioquímica. Projeto FAPESB/CNPq/LEMA/UCSal. Co-orientadora: Luzimar Gonzaga Fernandez, Doutora em Biologia Molecular Estrutural, Coordenadora do Projeto, Professora do ICS-UFBA, Coordenadora e Pesquisadora do LEMA/UCSal, luzimar@ucsal.br.

pesqueira e têm um forte impacto negativo na atividade turística, já que os resíduos petrolíferos, de remoção difícil, impedem durante muito tempo a utilização das praias.

A Indústria Petrolífera tem sido, nas últimas décadas, uma das mais poluidoras dos ecossistemas costeiros do litoral brasileiro e ecossistemas aquáticos continentais; isto é fruto dos diversos acidentes já promovidos pela mesma. A poluição provocada pelos derramamentos acidentais libera um volume de óleo que varia muito a cada tipo de acidente ocorrido (JESUS, 2003).

Este trabalho teve como objetivo isolar microrganismos que se desenvolvem em ambientes que contem metais, visando a caracterização e manipulação destes organismos para utilização em processos de biorremediação.

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA), na Universidade Católica do Salvador (UCSal). Selecionaram-se pontos de amostragem na região da Baía de Todos os Santos (ambiente impactado pela atividade petrolífera) para coleta de amostra de água e sedimento que posteriormente foram enviados ao LEMA/UCSAL para análises laboratoriais. Prepararam-se meios de cultura conforme se mostra na “Tabela 1” com a finalidade de isolar os microrganismos de interesse inoculando com a água e o sedimento coletados.

Tabela 1 – Tabela de meios de cultura utilizados

Meios de Cultura	Reagentes utilizados
Meio de enriquecimento – YPD	Extrato de levedo, Peptona de carne, Glicose – Meio líquido utilizado para nutrir os microrganismos presentes nas amostras
Meio Completo – Ágar YPDA	Extrato de levedo, Peptona de carne, Glicose, Ágar – Meio sólido utilizado para o isolamento e a maturação de microrganismos;
Meio Seletivo Metais 1	Extrato de levedo, Peptona de carne, Glicose, MgCl ₂ , ZnCl ₂ , PbCl ₂ , Agar
Meio Seletivo Metais 2	Extrato de levedo, Peptona de carne, Glicose, ZnCl ₂ , PbCl ₂ , Ágar
Meio Seletivo Metais 3	Extrato de levedo, Peptona de carne, Glicose, MgCl ₂ , ZnCl ₂

Metodologia utilizada

Os reagentes foram pesados e colocados em um becker de volume adequado adicionando água até atingir o 75% do volume final, posteriormente, foi homogeneizado numa placa agitadora. Após a homogeneização, o meio foi transferido para uma proveta de volume aproximado ao volume final desejado completando assim com água destilada. O meio foi transferido para um erlenmeyer (com uma capacidade no mínimo 25% maior que o volume final) fechado com uma rolha de gaze e algodão envolvidos com papel alumínio e posteriormente autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Para semear os meios, inoculou-se 10mL da água ou 10g do sedimento coletados nos meios de cultura líquido para nutrição dos microorganismos. Após 24 horas no shaker, foram utilizados para semear nos meios sólidos usando micropipeta e alça de platina. Assim foram incubados em estufa a 30°C, sempre observando o crescimento e após o crescimento celular (formação de colônias), as placas foram armazenadas a 4°C. Os microorganismos de interesse foram isolados em tubos utilizando alça de platina e crescidos em estufa a 30°C por 24 horas e, logo após o seu crescimento, guardados a 4°C.

Considerando a diversidade existente na Baía de Todos os Santos e os diversos problemas ambientais os quais vêm enfrentando, foram selecionadas 12 estações de amostragem com a finalidade de isolar microrganismos extremófilos que demonstram uma adaptação à vida nesses ambientes, contendo diferentes graus de contaminação aparente por metais pesados. Coletaram-se no total 17 amostras de água e 14 amostras de sedimento para posterior isolamento.

Os materiais biológicos (água e sedimento) foram coletados em nove pontos de amostragem conforme a “Tabela 2”.

Tabela 2 – Pontos de Coleta x Coordenadas Geográficas

Pontos de Coleta	Coordenadas Geográficas	
Jeribatuba	S 13°03'22''	W 38°47'48''
Coqueiro Grande	S 12°43'27''	W 38°33'04''
Caípe	S 12°42'49''	W 38°35'18''
Suape	S 12°44'05''	W 38°35'50''
Fábrica de Asfalto	S 12°43'58''	W 38°37'20''
Ilha de Pati	S 12°42'30''	W 38°37'14''
Ilha de Fontes	S 12°40'24''	W 38°39'08''
Ilha de Cajaíba	S 12°39'45''	W 38°41'21''
Cabuçu	S 12°45'45''	W 38°45'14''

Assim, foram isoladas 16 cepas de microorganismos extremófilos, com capacidade de crescimento, em altas concentrações de metais pesados, das amostras de água e sedimentos coletados “Figuras 1 e 2”, sendo que a maioria dos isolados desenvolveram-se a partir de amostras de sedimentos



Figura 1 - Fungos isolados em meio YPDA a partir de amostras coletadas na região da Baía de Todos os Santos.

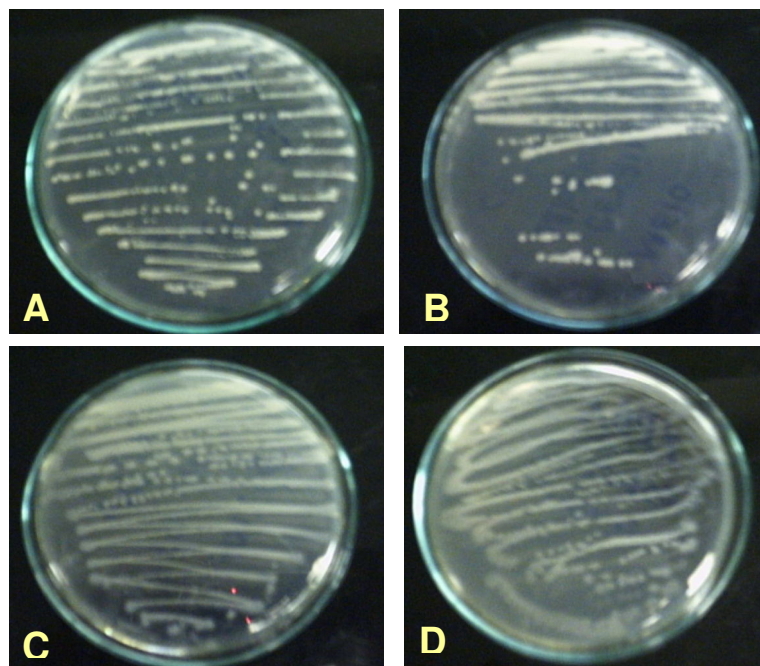


Figura 2 - (A) *Pseudomonas sp.* isoladas em meio Cetrimide; (B) Bactérias isoladas em meio seletivo Metais-1; (C) Bactérias isoladas em meio seletivo Metais-2 e (D) Bactérias purificadas em meio YPDA.

Com a finalidade de caracterizar os nove pontos de coleta onde as amostras foram obtidas, foram verificados pH, Oxigênio Dissolvido e Condutividade, análises qualitativas e descrição visual, permitindo uma ampla caracterização das áreas. Estas análises encontram-se descritas

Jeribatuba

pH: 7.9

Condutividade: 47.7 mS/cm / 31.1 Sal

O₂ Dissolvido: 61.9%

Descrição Visual: Área com solo lodoso e aparentemente mais conservada dos pontos de coleta.

Coqueiro Grande

pH: 7,89

Condutividade: 46,5 mS/cm / Sal 30.1

O₂ Dissolvido: 42,9%

Descrição Visual: Região com muitas pedras circundando e adentrando o manguezal; apresentando altíssima quantidade de lixo preso nas árvores e no chão; muitas algas e lixo doméstico na orla do mangue.

Caípe

pH: 7,81

Condutividade: 46,5 mS/cm / Sal 30,2

O₂ Dissolvido: 58,7 %

Descrição Visual: Solo arenoso, muito poluído. Ponto de coleta da água +/- 1,5 Km do local de coleta das folhas por causa da maré.

Suape

pH: 8,44

Condutividade: 48,3 mS/cm / Sal 31,4

O₂ Dissolvido: 82,1%

Descrição Visual: Local com solo rochoso, "ilhas" distintas de mangue; +/- 150m da margem do rio; 700m do mar; dos 3 pontos, foi o que apresentou maior quantidade de lixo (concentrado por trás do mangue em uma faixa de lixo e algas de maré); uma das ilhas de mangue (a mais próxima do ponto de coleta) apresentava grande quantidade de plântulas.

Fábrica de Asfalto

pH: 8,01

Condutividade: 46,0 mS/cm / 29,7 sal

O₂ Dissolvido: 64,5%

Descrição Visual: Solo arenoso, com consistência mais firme, próximo ao Porto de Atracação e a uma região pouco rochosa; água turva, apresentando muita sujeira e ponto de "mineração" de óleo.

Ilha de Pati

pH: 7,99

Condutividade: 44,4 mS/cm / 28,7 sal

O₂ Dissolvido: 66,4%

Descrição Visual: Local de solo lodoso, com presença intensa de atividade marisqueira, envolta por alguns bancos de areia, aparentemente pouca presença de lixo doméstico e rede de esgoto, presença de gramíneas.

Ilha de Fontes

pH: 7,94

Condutividade: 37,1 mS/cm / 23,6 Sal

O₂ Dissolvido: 70,3%

Descrição Visual: Local com solo lodoso e rochoso também; Apresentava pontos com "minadouros" de óleo, faixa estreita de mangue.

Ilha de Cajaíba

pH: 8.01

Condutividade: 39.4 mS/cm / 24.5 Sal

O₂ Dissolvido: 72%

Descrição Visual: Ilha com solo bastante rochoso, com diminuição da quantidade de lixo doméstico em relação às outras áreas.

Cabuçu

pH: 7,76

Condutividade: 39,9 mS/cm / Sal 25.4

O₂ Dissolvido: 62%

Descrição visual: Praia apresentando poluição por lixo doméstico: sacos plásticos de mercado, garrafas pet, pneus etc. Inúmeras saídas de esgoto, poucas plantas jovens, plantas possuindo folhas com alto grau de herbivoria. Presença excessiva de algas depositadas no solo.

A quantificação da biomassa microbiana (C-Biomassa) é um dos parâmetros mais utilizados em estudos de impactos ambientais sobre a microbiota dos solos. A biomassa microbiana é um dos componentes que controlam funções-chaves no solo, como a decomposição e o acúmulo de matéria orgânica, ou transformações envolvendo os nutrientes minerais. Representa, ainda, uma reserva considerável de nutrientes, os quais são continuamente assimilados durante os ciclos de crescimento dos diferentes organismos que compõem o ecossistema. Assim, solos que mantêm um alto conteúdo de biomassa microbiana são capazes não somente de estocar, mas também de ciclar mais nutrientes no sistema (STENBERG, 1999).

Já que a dinâmica do carbono no solo é mediada pelas comunidades microbianas, obviamente existe uma relação entre a quantidade e qualidade da matéria orgânica e a atividade e diversidade de microrganismos. Tem sido demonstrado que existe uma relação positiva entre a quantidade de matéria orgânica presente em um solo e a sua atividade microbiana medida pelo C-biomassa (SCHNURER et al., 1985).

Para o isolamento de microorganismos com capacidade de crescimento em ambientes que contenham diferentes concentrações de metais pesados, foram feitos 3 meios seletivos contendo 04 metais pesados (**Pb, Mn, Mg, Zn**). Conforme a metodologia utilizada neste trabalho de pesquisa, foram isolados das amostras de água e sedimentos coletadas na Baía de Todos os Santos (BA), 12 cepas de bactérias e 04 de fungos extremófilos, com capacidade de crescimento aeróbico na presença de metais pesados em concentrações de até 10 mM.

CONCLUSÃO

A análise preliminar do comportamento de microrganismos provenientes das amostras coletadas das áreas impactadas por atividades petrolíferas indicou que, perante as condições ambientais, houve o crescimento de microrganismos com um grande potencial de adaptação, pois os mesmos apresentaram a capacidade de crescer em condições desfavoráveis. Finalmente, é importante ressaltar a necessidade de selecionar as cepas mais tolerantes e resistentes para o emprego destas em processos biotecnológicos e de biorremediação.

REFERÊNCIAS

AMBIENTE BRASIL. Disponível em :

<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agua/salgada/index.html&conteudo=./energia/petroleo/vazamentos.html>. Acesso em 30/05/05.

CORREIO DA BAHIA. Disponível em:

<<http://www.correiodabahia.com.br/2001/08/04/noticia.asp?link=not000032464.xml>>. Acesso em 13 junho. 2005.

DA COSTA, A.C.A; DUTA, F.P. 2001. *Bras. J. Microbiol.* 32: 1-5.

De JESUS, J. F. Avaliação de Impactos Sobre a Biota da Zona da Refinaria Landulpho Alves (RLAM) para Sugestões de Remediação.2003. 13 f.

GERMEM. Disponível em: <http://ospiti.peacelink.it/zumbi/org/germen/tsantos.html>. Acesso em 01/06/05.

HERNANDEZ, A. *et al.* 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4317- 4320.

SCHNURER, J.; CLARHOLM, M.; ROSSWALL, T. Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. **Soil Biology and Biochemistry**. v.17, p.611-618, 1985.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Soil and Plant Science**, v.49, p.1-24, 1999.