

## II CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEIO AMBIENTE SUBTERRÂNEO

### **SELEÇÃO DE CONSÓRCIO DE MICRORGANISMOS PARA ESTUDO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO.**

SILVA, A.R.<sup>1</sup>; ALLI, R.P.; LEO, P.; LINHARES, D.C.; TARCITANO, E.; MELLO, C.M.;  
RODRIGUES, M.F.A.

**Resumo** – Devido ao uso contínuo de agrotóxicos, quantidades apreciáveis de pesticidas e seus produtos degradados podem acumular no ecossistema do solo. Os microrganismos estão entre os mais importantes agentes biológicos que removem estes resíduos e degradam materiais permitindo a sua reciclagem no ambiente. A proposta deste trabalho é avaliar a microbiota presente em um solo contaminado por um organoclorado, hexaclorociclohexano ou HCH (conhecido comercialmente como BHC). Posteriormente, o objetivo será verificar a capacidade deste consórcio de microrganismos na biorremediação do solo em questão. A contagem dos microrganismos resultou em uma concentração de  $6,3 \times 10^4$  UFC/g de solo em 24 h, e  $2,4 \times 10^6$  em 48h de incubação. Após seleção, foram considerados oito microrganismos para os testes de biorremediação.

**Abstract** – Due to the continuous use of pesticides, considerable quantities of pesticides and their degraded products can accumulate in the soil ecosystem. Microorganisms are among the most important biological agents that remove and degrade these waste materials allowing their recycling on the environment. The purpose of this study is to assess the microorganisms present in soil contaminated by an organochlorine, hexachlorocyclohexane or HCH (commercially known as BHC). Subsequently, the objective is to verify the ability of this consortium of microorganisms in soil bioremediation. Tests resulted in a concentration of  $6.3 \times 10^4$  CFU/g soil in 24 h, and  $2.4 \times 10^6$  CFU/g at 48h. After selection, eight microorganisms were considered for bioremediation tests.

**Palavras-Chave** – HCH, biorremediação, bioestimulação, bioamplificação.

---

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT. Av. Prof. Almeida Prado, 532. Cid. Universitária. 05508-901. São Paulo-SP. Fone :3767-4830. [aliners@ipt.br](mailto:aliners@ipt.br) [aliners@usp.br](mailto:aliners@usp.br)

## INTRODUÇÃO

Uma definição específica de biorremediação postula que os contaminantes orgânicos são convertidos em CO<sub>2</sub>, água e íons inorgânicos, bem como a oxidação ou redução desses íons inorgânicos. Uma definição mais ampla de biorremediação incluiria o uso de processos biológicos para melhorar os extremos do pH; concentrando os contaminantes de modo que pudessem mais facilmente ser removidos por técnicas físicas; convertendo a espécie tóxica em formas menos tóxicas e, deste modo, recuperar os locais contaminados ou perturbados para que voltem a ser ecossistemas funcionais (ABHILASH et al, 2008).

A diversidade microbiana oferece uma variedade de possibilidades para a mineralização dos contaminantes ou da sua transformação em compostos menos perigosos e menos prejudiciais aos seres vivos e ao meio ambiente. Aliando o conhecimento sobre diversidade e metabolismo microbiano aos avanços da biotecnologia, a biorremediação tornou-se uma das áreas de restauração ambiental que tem se desenvolvido mais rapidamente.

A microflora do solo, principalmente bactérias, fungos, algas e protozoários dão uma valiosa contribuição no sentido de tornar o solo fértil através do seu papel catabólico primordial, degradando resíduos de plantas e animais, atuando na ciclagem dos nutrientes orgânicos e inorgânicos do solo. Pesticidas que interrompem as atividades destes microorganismos podem afetar a qualidade nutricional dos solos e, portanto, causar graves consequências ecológicas (HANDA *et al.*, 1999).

Uma explicação plausível para a notável capacidade dos microrganismos em degradar uma enorme variedade de substâncias está no fato de que os micróbios coexistiram por bilhões de anos com uma imensa variedade de compostos orgânicos (DUA *et al*, 2002). A vasta diversidade de substratos potenciais para o crescimento levou a evolução de enzimas capazes de transformar os mais diferentes compostos através de mecanismos catalíticos distintos.

## METODOLOGIA

### **Determinação da concentração e diversidade microbiana nas amostras do solo contaminado.**

Para a quantificação inicial dos microrganismos, os procedimentos foram baseados no Manual de Testes para avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos do IBAMA, ensaio “E.1.1.2 - Teste de Biodegradabilidade Imediata de substâncias orgânicas

hidrossolúveis ou pouco hidrossolúveis, porém não voláteis, pela medida do Dióxido de carbono desprendido em sistema aberto”. Uma mistura de 250g de solo contaminado (resíduo) em 1 litro de água destilada foi colocada sob agitação por 15 minutos para homogeneização. Em seguida, esta suspensão passou por decantação durante 15 minutos e, posteriormente, foi filtrada em gaze para retenção de grandes partículas. Uma alíquota de 1mL da suspensão de solo foi depositada em 9mL de solução salina (0,85%) e assim foram feitas sucessivas diluições (de  $10^{-1}$  até  $10^{-5}$ ). Os procedimentos foram realizados em triplicata (3 placas para cada diluição e para cada meio), sendo utilizados para quantificação de bactérias os meios Tryptic Soy Agar - TSA (Oxoid CM 129) e Cetrimide e para quantificação de fungos, o meio Potato Dextrose Agar - PDA (Merck 1.10130.500) com adição de 200  $\mu$ L de ácido tartárico (inibidor de bactérias).

O crescimento dos microrganismos presentes em cada uma das diluições foi evidenciado após incubação das placas em estufa à 30°C. As contagens de unidades formadoras de colônias (UFC/g) foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação. Em seguida procedeu-se o isolamento e caracterização das diferentes colônias obtidas. Além da distinção da morfologia de colônias dos isolados foi também realizada a técnica de coloração diferencial de Gram. Esta técnica é utilizada frequentemente em microbiologia, na qual o esfregaço bacteriano é fixado em lâmina e tratado com as seguintes soluções: a) solução de cristal violeta por 1 min, b) solução de iodo (lugol) por 1 min (complexo cristal violeta-iodo), c) álcool ou álcool-cetona (agente descorante), d) coloração com fucsina básica ou safranina por 30s (contra corante). As bactérias Gram-positivas coram-se com o cristal violeta e as Gram-negativas, em vermelho (contra corante –fucsina ou safranina) (PELCZAR *et al.*, 1997).

### **Tolerância da microbiota do resíduo ao HCH em meio líquido**

Este teste consistiu em submeter durante uma semana a microbiota do resíduo a um ambiente com concentrações de HCH maiores que as encontradas na amostra de origem. Desta forma, os microrganismos que tiveram a capacidade de sobrevivência no meio podem também apresentar a capacidade de degradação deste organoclorado. Para tanto, foram preparados frascos com concentrações diferenciadas de HCH, proveniente do produto comercial BHC diluído em acetona (0,75g de BHC em 25mL de acetona de grau analítico). O BHC comercial, recebido do CETAE e utilizado neste trabalho, apresentou apenas 7% de HCH (detectado por espectrometria de massa).

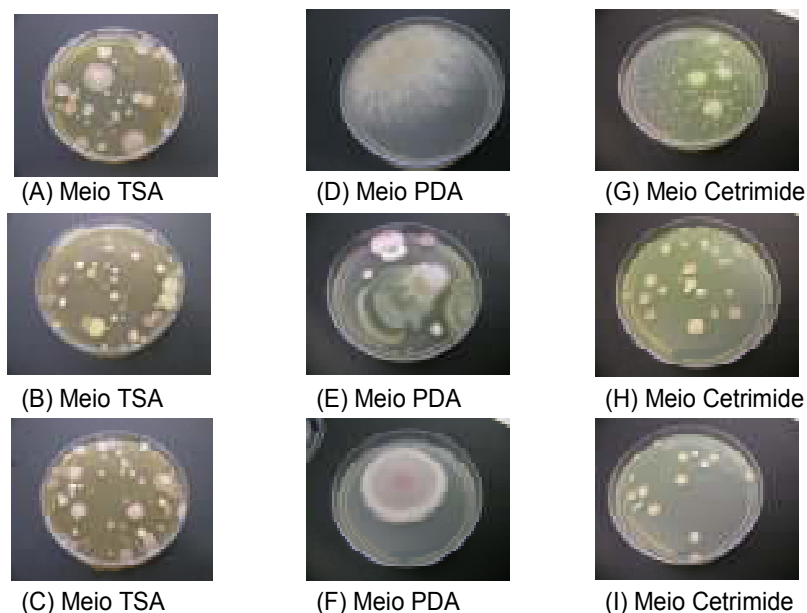
Após a adição de acetona ao BHC, e após o material em suspensão decantar, retirou-se alíquotas do sobrenadante contendo diferentes quantidades de HCH que foram

transferidas para frascos de Erlenmeyers vazios de 250mL de capacidade. Após a secagem e evaporação da acetona, adicionou-se aos frascos 100mL de água destilada estéril e 25g de resíduo. Cada um dos 3 Erlenmeyers ficou com as seguintes concentrações de HCH: 30ppm, 15ppm e 3ppm. Após uma semana de incubação foi determinada a concentração de microrganismos viáveis de cada um dos três tratamentos. Em seguida procedeu-se o isolamento e caracterização das diferentes colônias obtidas na condição de maior concentração de HCH, que seriam utilizadas para a composição do *pool* de microrganismos a ser adicionado nas condições com bioamplificação do ensaio de tratabilidade.

## RESULTADOS

Uma grande variedade de microrganismos foi encontrada nas amostras de solo contaminadas com HCH. A contagem dos microrganismos nas placas resultou numa concentração de  $6,3 \times 10^4$  UFC/g de solo em 24 h, e  $2,4 \times 10^6$  em 48h de incubação.

Algumas das colônias distintas morfológicamente foram isoladas e preservadas, incluindo 14 colônias de bactérias e leveduras, e 26 colônias de fungos. Na Figura 1 está representada a diversidade microbiana encontrada no resíduo. Na Figura 2, algumas das colônias de fungos observadas estão representadas em detalhes.



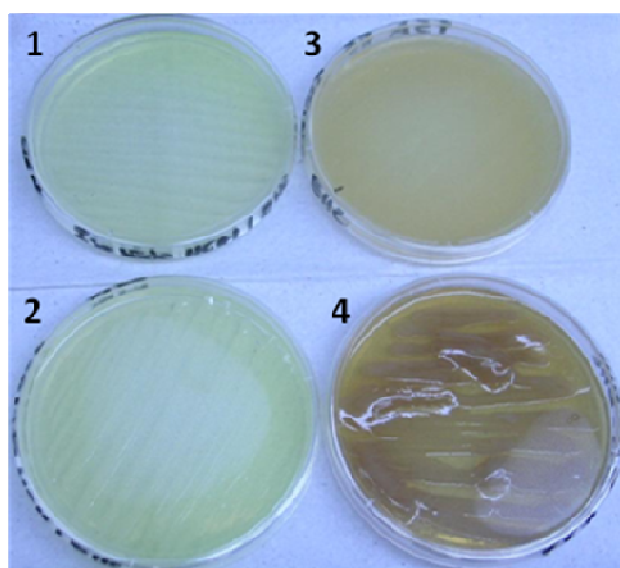
**Figura 1:** Diversidade microbiana detectada na amostra de resíduo contaminado com HCH. Nas fotos A, B e C está representado o crescimento de bactérias em meio TSA. Nas fotos D, E e F visualizam-se algumas colônias de fungos em meio PDA e em G, H e I encontram-se bactérias crescidas em meio seletivo para *Pseudomonas* sp.



**Figura 2.** Representação de colônias de fungos presentes no solo contaminado por HCH.

Após a exposição da microbiota do resíduo, durante uma semana, a diferentes concentrações de HCH comercial (BHC) em meio líquido, a concentração microbiana foi verificada em meio sólido isento de HCH. A contagem de microrganismos que tiveram contato com 15 ou 30ppm de BHC foi de  $1 \times 10^7$  UFC/g de solo após 48 h de incubação.

Deste crescimento pós exposição ao HCH foram isoladas 3 colônias de bactérias, 1 de levedura e 3 de fungos filamentosos para serem usados em ensaio para avaliação da tratabilidade do resíduo por biorremediação. Nas Figura 3 e 4 estão ilustradas as colônias selecionados para a preparação do *pool* de microrganismos.



**Figura 3:** Bactérias (1, 2 e 4) e levedura (3) resistentes a HCH selecionadas para ensaio de tratabilidade do solo contaminado.



**Figura.4:** Três dos Fungos filamentosos resistentes a HCH selecionados para ensaio de tratabilidade do solo contaminado.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHILASH, P.C.; SINGH, N. Influence of the application of sugarcane bagasse on lindane ( $\gamma$ -HCH) mobility through soil column: Implication for biotreatment. **Bioresource Technology**. 2008. 99; 8961–8966.
- DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations., **Appl Microbiol Biotechnol**. 2002. Jul;59(2-3):143-52.
- HANDA, S.K.; AGNIHOTRI, N.P.; KULSHRESHTHA, G. Effect of pesticide on soil fertility. In **Pesticide residues; Significance, Management and analysis**. 1999. pp 184–198.
- PELCZAR, M. J. ; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2ª edição; São Paulo-SP: Makron Books, 1997. v.2
- PHILLIPS, T.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T.; SEECH, A.G. Mineralization of hexachlorocyclohexane in soil during solid-phase bioremediation. **J Ind Microbiol Biotechnol** (2004) 31: 216–222.