

ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DO *BACILLUS SPP.* RESISTENTE A METAIS PESADOS ISOLADOS DE AMBIENTES CONTAMINADOS

Gabrielle Barbosa BORGOMONI¹; Profa. Dra. Cleide Barbieri de SOUZA²

¹ Centro Universitário Lusíada – Acadêmica de Biomedicina, gbborgomoni-biomedicina@hotmail.com;

² Centro Universitário Lusíada – Núcleo Acadêmico de Estudos e Pesquisas Em Biotecnologia e Biologia Molecular, cleidebarbieri@gmail.com

Introdução

A água é um elemento fundamental para a sobrevivência. Hábitos sustentáveis e o consumo consciente se faz necessário para que se reverta a situação atual dos recursos hídricos. Apesar de haver grande quantidade de água no planeta Terra, a água apropriada para o consumo humano (doce) é limitada.

Atividades industriais têm causado inúmeros acidentes ecológicos, como o petróleo extraído dos mares e metais pesados usados na mineração e lançados na água por acidente, ou negligência, o grande número de dejetos das grandes cidades, descartados em córregos, rios e mares também contribuem para a poluição e contaminação das águas, além de muitos outros.

Um exemplo dessa situação ocorre na cidade de Cubatão (São Paulo/Brasil), que tem sido alvo de pesquisas, pelo seu alto nível de contaminação em sedimentos nas áreas costeiras. Dentro dos compostos polutivos inorgânicos os metais pesados se destacam pelo seu alto nível de toxicidade, sua exposição acarreta graves danos a saúde de diversos ecossistemas, devido ao seu potencial bioacumulativo.

Existem processos químicos/físicos que são utilizados para remover metais pesados, porém apresentam limitações a níveis técnicos e econômicos, o que levou a procura de novas tecnologias, nesse contexto destacou-se a biorremediação, como alternativa eficiente e de baixo custo se comparado as metodologias convencionais.

O objetivo deste estudo é a análise de resistência a metais pesados de um microrganismo do gênero *Bacillus* (gram +), o qual foi isolado em um trabalho anterior, com espécie ainda desconhecida, o qual é altamente resistente ao íon mercúrio isolado do Rio Cubatão (Figura 1), além de sua identificação molecular para distinguir sua espécie.

Figura 1 – Local da coleta da amostra onde foi isolado o *Bacillus spp.* Gram + (seta).



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2015.

Metodologia

Foi realizada uma pesquisa sobre a região 16sRNA, região hiperconservada em bactérias, utilizada para a identificação, em busca de uma sequência nucleotídica de primers forward e reverse específica para *Bacillus*. A região hipervariante (HV) promove grande satisfação para a identificação rápida das espécies deste tipo de microrganismo. Sendo assim, para a amplificação e sequenciamento da região em questão do *Bacillus spp.* isolado, solicitamos a síntese de um par de primer (Goto et al., 2006).

Para tanto foi realizada uma extração genômica seguindo o protocolo do kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (QIAGEN®): 200µl do inóculo previamente homogeneizada da amostra foi associada a 200µl de solução de lise, 20µl de proteinase K e 200µl de água bidestilada em microtubo eppendorf, seguido de agitação em vortex por 15 segundos, incubação a 56°C em termobloco por 10 minutos e adição de 200µl de etanol; sendo novamente homogeneizado em vortex por 15 segundos. Todo o material foi transferido para tubo coletor com coluna de membrana do Kit e então centrifugado em 8.000 rpm por 1 minuto (Figura 2-A). O filtrado foi descartado, enquanto a coluna foi

transferida para outro tubo coletor, seguida de processo de lavagem da membrana com 750µl da solução AW1, com centrifugação repetida nas mesmas condições, o filtrado foi descartado e novamente a membrana foi lavada com 750µl da solução AW2, após a centrifugação a coluna de membrana foi transferida para um eppendorf e o DNA presente na membrana foi ressuscitado em 30µl de solução de eluição, incubado por 3 minutos, seguindo de centrifugação de 8.000 rpm por 4 minutos. A partir da solução de DNA extraído presente no tubo final (Figura 2-B), 8µl foram utilizados para o preparo do gel de agarose para realizar o perfil eletroforético do dna genômico do *Bacillus spp.*

Figura 2 – Extração e análise do DNA genômico do *Bacillus spp.*



FIGURA 2A- Centrifugação da amostra.

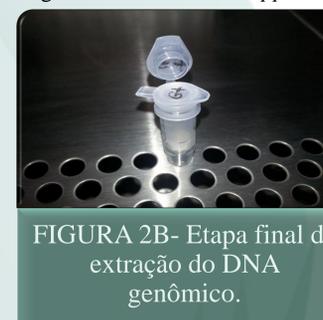


FIGURA 2B- Etapa final da extração do DNA genômico.

Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2015.

Resultados Preliminares

A extração genômica foi realizada com sucesso na análise eletroforética como mostra a figura 3.

Figura3 – Perfil eletroforético do DNA genômico bacteriano em estudo (gel de agarose).



1) Ladder 1Kb; 2) DNA genômico do *Bacillus*.

Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2015.

Etapas Futuras

Como etapas futuras deste estudo serão realizados: amplificação e sequenciamento da região 16S do rRNA para identificação da espécie e análises de resistência do *Bacillus* frente a outros íons metálicos.

Referências Bibliográficas

BAVYKIN, Sergei G et al. **USE OF 16S RRNA, 23S RRNA, AND GYRB GENE SEQUENCE ANALYSIS TO DETERMINE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *BACILLUS CEREUS* GROUP MICROORGANISMS.** 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC497648/>> Acesso em 14 de março de 2015.

GOTO, Keiichi et al. **APPLICATION OF THE PARTIAL 16S rDNA SEQUENCE AS AN INDEX FOR RAPID IDENTIFICATION OF SPECIES IN THE GENUS *BACILLUS*.** 2005. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/46/1/46_1_1/_article> Acesso em 11 de março de 2015.

GOTO, Keiichi et al. **EVALUATION OF THE HYPERVARIABLE REGION IN THE 16S RDNA SEQUENCE AS AN INDEX FOR RAPID SPECIES IDENTIFICATION IN THE GENUS *PAENIBACILLUS*.** 2006. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/48/5/48_5_281/_article> Acesso em 11 de março de 2015.

INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, **ÁGUA DOCE E LIMPA: DE “DADIVA” À RARIDADE.** 2005. Disponível em: <<http://www.socioambiental.org/esp/agua/pgn/>> Acesso em 30 de março de 2015.

Promoção

Centro Universitário Lusíada – UNILUS
Programa de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão do UNILUS - PPGPE
Comitê Institucional de Iniciação Científica do UNILUS - COIC
Núcleo Acadêmico de Estudos e Pesquisas em Educação e Tecnologia do UNILUS - NAPET

Agradecimentos:

“Núcleo Acadêmico de Estudos e Pesquisas em Biotecnologia e Biologia molecular”.

