

CAMILA FERNANDEZ DA SILVA

Bacharelado em Biomedicina no Centro
Universitário Lusíada - UNILUS.

CLEIDE BARBIERI DE SOUZA

Professora Universitária, Pesquisadora,
Coordenadora do Núcleo Acadêmico de Estudos
e Pesquisas em Biotecnologia e Biologia
Molecular (NAPBBM) do Centro Universitário
Lusíada - UNILUS.

Recebido em março de 2017.
Aprovado em abril de 2017.

PROTÓTIPO PARA ISOLAR BACTÉRIAS BIORREMIADORAS DE ÁGUAS COM METAIS PESADOS NA BAIXADA SANTISTA

RESUMO

O sistema estuarino da Baixada Santista se destaca como importante exemplo brasileiro de degradação ambiental devido considerável quantidade de metais pesados gerados pelo polo industrial de Cubatão. Este estudo visa isolar microorganismo resistente a íons metálicos de amostras desta região, formador de biofilme em sistema aeróbio em biorreator. Foram realizadas duas etapas, a primeira, construção do protótipo baseado em tanque de vidro com eixo central, superfície rotacional e velocidade constante 3 rpm. Na segunda, análise microscópica da estrutura do biofilme, caracterizando o crescimento microbiológico na superfície do reator em meio de cultura com concentrações significativas de metais pesados baseadas na literatura. Como resultado foi isolado o microorganismo e sua identificação preliminar realizada pelas técnicas microbiológicas, as quais demonstraram que é *Arizona hinshawii*, um subgrupo das *Salmonellas*, também chamada *Salmonella arizonae*.

Palavras-Chave: Biorremediação. Metais pesados. Biofilme. Biorreator.

PROTOTYPES FOR ISOLATION BIORREMIATOR BACTERIA OF WATER WITH HEAVY METALS IN BAIXADA SANTISTA

ABSTRACT

The estuarine system of the Baixada Santista stands out as an important example of environmental degradation due to the considerable amount of heavy metals generated by the Cubatão industrial pole. This study aims to isolate microorganism resistant to metal ions from samples of this region, forming a biofilm in aerobic system in bioreactor. Two steps were performed, the first, prototype construction based on glass tank with central axis, rotational surface and constant speed 3 rpm. In the second microscopic analysis of the biofilm structure, characterizing the microbiological growth on the surface of the reactor in culture medium with significant concentrations of heavy metals based on the literature. As a result the microorganism was isolated and its preliminary identification performed by microbiological techniques, which demonstrated that it is *Arizona hinshawii*, a subgroup of *Salmonellas*, also called *Salmonella arizonae*.

Keywords: Bioremediation. Heavy metals. Biofilm. Bioreactor.

INTRODUÇÃO

O Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, localizado na Bacia Hidrográfica da Baixada Santista, situada na Região Metropolitana da Baixada Santista, que compreende os municípios de Cubatão, Santos, São Vicente, Guarujá e Praia Grande é uma ampla rede de canais estuarinos e extensos manguezais, confinados entre o oceano e as escarpas da Serra do Mar, com um complexo emaranhado de rios (Piaçabuçu, Paranhos, Cubatão, Morrão, Perequê, Moji da Onça, Quilombo, Jurubatuba, Diana, Santo Amaro, Bertioiga, Casqueiro, Santana entre outros (SIQUEIRA et al., 2004; PARREIRA, 2012).

De acordo com o relatório estuarino de Santos e São Vicente realizado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), em 2014. Os metais Zinco, Cádmio, Mercúrio, Cromo, Níquel, Cobre e Chumbo, ainda nos tempos atuais continuam sendo uma problemática da região. São encontrados nos sedimentos na região da Baixada Santista acima das concentrações limites os quais provocam efeitos severos aos organismos aquáticos.

O estudo de Luiz-Silva et al (2002), demonstrou que o Rio Cubatão constitui no principal veículo poluidor, um dos principais motivos apontados é que ele recebe a principal carga de efluentes do setor industrial de Cubatão (siderúrgica, petroquímica e de fertilizante), que lança suas águas poluidoras, e em locais que em virtude do movimento das marés, avançam suas águas sobre as drenagens tributárias, promovendo a dispersão da poluição muitas vezes de metais tóxicos.

O Rio Cubatão possui a maior poluição por mercúrio, e historicamente vem apresentando níveis significativos desse metal desde a década de 80, por meio de estudos geoquímicos em sedimentos de programas governamentais. Com essa repercussão sendo discutida a nível mundial, foram implantadas medidas para reduzir a poluição da região, mas os impactos da poluição são sofridos continuamente (CETESB, 1989; LUIZ-SILVA et al., 2002). As poluições dos sedimentos do Rio Cubatão continuam a chamar a atenção, o que indica a necessidade de estudos mais detalhados das possíveis fontes de contaminação a fim de identificar o que podem estar contribuindo com a qualidade do sedimento, como sua fonte poluidora e seus poluentes.

CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR METAIS PESADOS

A contaminação de metais pesados de efeito antrópico, tiveram início na idade Média com as atividades mineradoras, acelerando-se no século XIX com processamento de metais em plantas químicas e de fundição, com início das atividades industriais aliada ao rápido crescimento populacional (BERTOLAZI et al., 2010). O termo “metais pesados” é utilizado para elementos químicos, neste caso, com poder contaminante do meio ambiente, provocando diferentes danos à biota.

Os organismos exibem diversas respostas na presença excessiva de metais tóxicos, conferindo auto resistência. Os eucariotos são mais sensíveis à toxicidade de metais que as bactérias, pois essas possuem mecanismos de regulação típicos para as concentrações intracelulares de íons metálicos (VALLS; LORENZO, 2002).

A toxicidade dos metais pesados aliada à absorção/adsorção constante dos íons pelas células microbianas leva a sistemas de homeostase ou mecanismos de resistência visando sua proteção contra a toxicidade destes elementos. Portanto, a presença frequente destes íons metálicos no meio ambiente servirá para selecionar microrganismos autóctones resistentes ou para gerar ou aprimorar o desenvolvimento de mecanismos de resistência destes microrganismos frente a estes íons metálicos.

BIORREMEDIAÇÃO

A degradação ambiental é um dos aspectos mais críticos causado direta e indiretamente pelo homem. Regiões que antes tinham quantidades em recursos hídricos,

hoje começam a dar sinais de escassez, e a explicação é o desperdício com a exploração excessiva, o assoreamento dos rios e a poluição das fontes. De acordo com a ONU, até 2025, se os atuais padrões de consumo se mantiverem, duas em cada três pessoas no mundo vão sofrer escassez moderada ou grave de água (VICTORINO, 2007).

Cuidar da água e usá-la de forma sustentável é a grande preocupação da sociedade responsável. A proteção dos mananciais, recuperação de rios poluídos, exercício da educação ambiental e uso consciente da água são necessários tanto para a qualidade de vida hoje como para a sobrevivência das futuras gerações. A biotecnologia pode contribuir muito na melhoria ambiental, minimizando os impactos negativos causados sobre a biosfera. Atuando em vários segmentos, e um deles, a biorremediação.

Segundo Yakubu (2007), o termo biorremediação pode ser definido como um processo biotecnológico no qual se utiliza o metabolismo de microrganismos para reduzir os poluentes a níveis de concentrações aceitáveis os transformando em compostos de baixa ou nenhuma toxicidade. Atualmente a ação dos microrganismos sobre os metais tem sido objeto de numerosos estudos, em virtude do seu potencial de aplicação.

Os tratamentos convencionais de ambientes contaminados por metais envolvem processos físico-químicos de precipitação; floculação; eletrólise; cristalização ou adsorção; entretanto, estes processos são onerosos e/ou contribuir para formação de novos contaminantes ambientais, assim, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e econômicas (UNZ; SHUTTLEWORTH, 1996; LOVLEY et al, 1997; RIAZ-UL-HAQ; SHAKOORI, 2000; PINTO et al., 2002). Daí se destaca o processo de biorremediação.

Existem microrganismos que excretam substâncias que provocam a precipitação dos metais sob uma forma insolúvel (biomineralização); outros internalizam os íons metálicos por meio de processos de transporte ativo (bioacumulação ou biossorção); outros ainda adsorvem passivamente os íons metálicos sobre a superfície celular (adsorção). Esses diferentes processos são válidos para a descontaminação de águas contaminadas por metais pesados, embora, a biossorção constitua a abordagem mais largamente utilizada (BARKAY & SCHAEFER, 2001).

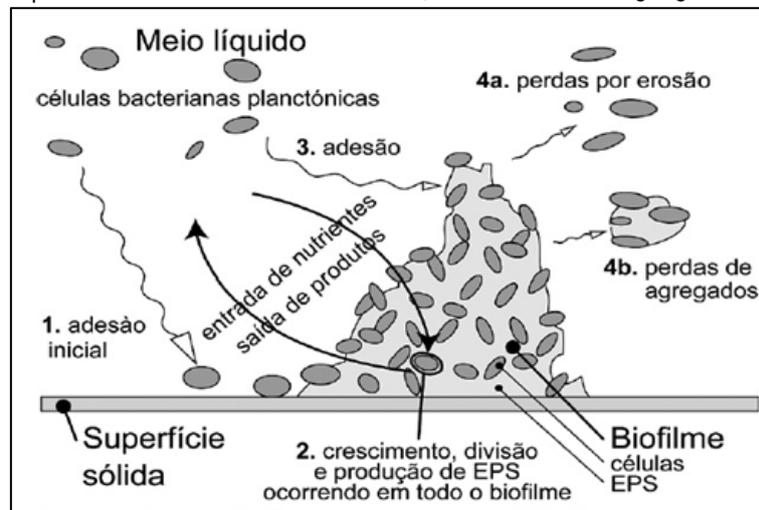
BIOFILMES E A BIORREMEDIAÇÃO

Embora para o homem o biofilme tenha seu lado prejudicial, como a deterioração de superfícies nas ciências médicas e na indústria, também possui seu lado benéfico do ponto de vista biotecnológico.

Biofilme é um complexo do ecossistema microbiano altamente dinâmico que atua de forma coordenada, aderidas às superfícies bióticas ou abióticas (sésseis) ou suspensas em solução (planctônicas), cujas células podem ou não estar envolvidas por uma matriz de exopolímeros (polissacarídeos, proteínas e lipídeos), podendo ser formada a partir de uma única ou de múltiplas espécies microbianas (SCHNEIDER, 2007; XAVIER et al., 2003).

De acordo com Mello (2007) os biofilmes são constituídos por água, microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas. Portanto dois aspectos, distinguem os microrganismos compondo biofilme de suas contrapartes de vida livre. O primeiro é a capacidade para produzir uma matriz EPS coerente, que resulta em ligação firme com a superfície (COSTERTON et al., 1987; DONLAN & COSTERTON, 2002). O segundo aspecto é o comportamento coordenado das células incorporadas nessa matriz, devido à comunicação através de um processo conhecido como *Quorum Sensing*. As etapas de formação de biofilme estão esquematizadas na figura 1.

Figura 1: 1. Transporte de células livres do meio líquido para superfície sólida. 2. Proliferação celular fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante e produção e excreção de EPS. 3. Adesão celular - formação do biofilme. 4. Liberação de biomassa: (a) Erosão (perda de células individuais); (b) Perda de agregados maiores.



Fonte: Xavier, et al., 2003.

Segundo Mittelman (1998) os biofilmes proporcionam aos microrganismos aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme; proteção contra fatores ambientais agressivos como flutuações de pH, sais e metais pesados, desidratação, forças de tensão de corte, bactericidas e antibióticos; possibilidade de troca de material genético devido aos longos tempos de retenção dos microrganismos; desenvolvimento de micro-consórcios que permitem a simbiose, uso de substrato de difícil degradação; capacidade de colonizar nichos ecológicos.

A biorremediação mediada pelo biofilme é mais segura para os microrganismos promovendo melhor possibilidade de adaptação e sobrevivência por se encontrarem protegidos em uma matriz. Estudos relatam o uso de biofilmes para tratamentos de água e esgoto desde 1980. Contudo, foi somente durante as últimas décadas que os reatores de biofilmes se tornaram um foco de interesse para os pesquisadores da área da tecnologia do processo da biorremediação (SINGH et al., 2006).

BIORREACTORES

Os biorreatores são sistemas que podem apresentar diversas configurações e arranjos. Esses sistemas são compostos por microrganismos e possivelmente por outros agentes catalíticos, que agem cooperativamente com os microrganismos. Esses sistemas podem ser divididos em dois grupos: sistema de biomassa suspensa e sistema de biomassa aderida em superfície (MELLO, 2007). O de biomassa suspensa, lagoa aerada agitada, lodos ativados, reatores biológicos com membranas com módulo interno/externo, sendo necessário no final do processo que os microrganismos sejam separados da fase líquida, podendo ou não voltar ao biorreator. O de biomassa aderidas, o conjunto de células microbianas constituídas em biofilmes juntamente com as EPS, encontra-se fixada a suportes sólidos (MELLO, 2007). Os substratos e nutrientes são transportados por mecanismo difusivo ao longo do biofilme (CONSTERTON et al., 1995; BRANDÃO, 2002).

O suporte de adesão dos microrganismos pode ser fixo ou móvel. No fixo, os microrganismos ficam imobilizados em suportes imóveis, formando leito permeável para o efluente percolar. O móvel são aqueles em que os microrganismos são imobilizados em suportes que podem ser movidos mecanicamente (discos biológicos- "rotating biological contactor") ou por ação hidráulica (biorreatores de leito expandido, fluidizado e "airlift") (MELLO, 2007).

Neste sistema se destacam os bacilos Gram negativos, por possuir parede celular complexa com presença de proteínas que auxiliam na formação dos biofilmes, capacidade de adesão, e ainda por se destacarem pela ocorrência generalizada de *Quorum sensing* entre suas comunidades, além de estudos que demonstram sua capacidade adaptativa e de bio-sorção em ambientes contaminados por metais pesados, devido as proteínas de membranas que ainda estão em estudos para melhor compreensão de seus mecanismos de ação (VALLS; LOURENZO, 2002; ASSAN, 2006; BURATO; COSTA; FERREIRA, 2012).

A bactéria Gram negativa, a *Salmonella spp.* pertence à família *Enterobacteriaceae*, que como será visto nesse estudo, enquadrará nas características aqui mencionadas.

SALMONELLA SUBGRUPO ARIZONAE

A *Salmonella sp.* é o grupo mais complexo das *Enterobacteriaceae*, com mais de 2200 sorotipos descritos no esquema de Kauffman-White. Todas as primeiras espécies e subgrupos de *Salmonella* e *Arizona* são consideradas como a mesma espécie, mas podem ser separados em subgrupos distintos, onde se encontra a *S. arizonae*, que pode ser identificada microbiologicamente (KONEMAN et al., 2001). Previamente classificada como *Arizona hinshawii*, esta espécie é similar a *Salmonella* do ponto de vista antigênico, clínico e epidemiológico.

As cepas de *Salmonellas sp.* são conhecidas por serem formadoras de biofilmes e produtoras de EPS (MALCOVA et al., 2009). Foi observado que este tipo de característica de crescimento pode ser devido à produção de *CurlI*, que possui a função de adesão a superfícies, agregação das células e mecanismo de resistência ao meio ambiente (BRANDA et al., 2005; CHEN et al., 2014).

Estudos mostram que *Salmonella spp.* são resistentes a antibióticos como: trimetoprim, estreptomicina, sulfonamidas, neomicina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina e cefalosporina (D'AOUST et al., 1990; SHANE et al., 1990; DIAZ et al., 2006; LIU et al., 2014). A capacidade de resistência antimicrobiana pode ser relacionada com o mecanismo de resistência aos metais pesados pois os genes que expressam os fatores de resistência estão inseridos no mesmo elemento gênico, como integrons presente ao cromossomo ou aos plasmídeos conjugativos da *Salmonella spp.* (SILVA, 2011; MOREIRA, 2012).

As alterações genéticas são complexas já que podem ser mantidas por tempos indeterminados e transferidas entre as gerações bacterianas (SILBERGELD; GRAHAM; PRICE, 2008). Já é conhecido que as *Salmonellas spp.* possui o plasmídeo pRST98, importante na promoção da formação de biofilmes, tornando-os mais viscosos e robustos, e há estudos que transferiram esse plasmídeo para uma *E. coli* e observaram que ela apresentou melhorias na formação de biofilme (LIU et al., 2014). Possuem também, o gene *phsABC* presente no óperon do seu plasmídeo pEB40, esse gene gera a partir de tiosulfato inorgânico o sulfeto de hidrogênio, precipitando os íons de metais; pode ser transferido para certas bactérias, o que lhes permite tolerar ou remover os metais pesados do ambiente contaminado, como pôde ser visto no estudo de Bang, Clark e Keasling (2000) que transferindo *phsABC* de *Salmonella* para *Escherichia coli* DH5 α , mostrou sua eficiência na produção de sulfeto de hidrogênio que resultou na remoção do metal.

Por isso é fundamental os estudos baseados nos mecanismos de resistência dos microrganismos, pois estes são amplamente importantes para a biotecnologia ambiental, para o desenvolvimento de processos de biorremediação de ambientes contaminados com compostos tóxicos orgânicos e inorgânicos.

OBJETIVO

A construção de um protótipo baseado em reator de vidro com eixo central rotacional visando à produção de biofilmes a partir de microrganismos resistentes a íons metálicos isolados de amostras de ambientes contaminados, da região da Baixada Santista. Identificação do gênero do microrganismo isolado utilizando técnicas clássicas da microbiologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

CONSTRUÇÃO DO PROTÓTIPO

Foi realizada a construção de um protótipo de reator com eixo central/superfície com sistema rotacional, em um tanque de vidro com volume total de 32,4 L, com suportes de acrílico e a superfície rotativa em tubo de material PVC tracionada por um eixo central conectada ao motor, através de engrenagens, calculadas para funcionar exatamente na velocidade de 3 rpm para a melhor aderência e/ou imobilização da biomassa e conseqüentemente formação de biofilmes (Figura 2).

Figura 2: Protótipo de reator de eixo central com sistema rotacional em tanque de vidro.



COLETA AMBIENTAL

Foi realizada uma coleta no Rio Cubatão localizado no município de Cubatão (SP), cujas coordenadas foram latitude: -23.879954 e longitude: -46.421845. Foram coletados água, sedimento e solo próximo ao córrego. Para coleta da água, foram usados tubos falcon estéreis; para o sedimento no fundo do córrego, foi utilizado um instrumento previamente higienizado chamado Van Veen. Para o armazenamento das amostras foram utilizados sacos plásticos estéreis. O pH no momento da coleta foi medido com tiras indicadoras de pH e foi observado valor de pH 6, e com termômetro de aquário introduzido no sedimento, foi medida a temperatura de 23°C. A aparência, do rio como pode ser observada na figura 3, era de não contaminação, com ausência de odores.

Figura 3: Foto do Rio Cubatão no momento da coleta.



PREPARO DAS AMOSTRAS E SOLUÇÕES DE METAIS

As amostras coletadas foram inoculadas no protótipo, 20 ml de água; o sedimento e solo, 1 grama foram colocados em frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada, homogeneizada em proporção de 1:100 (p/v), com leve agitação e incubação à temperatura ambiente por 20 minutos visando ressuspender todo material biológico presente no homogenato.

Para o preparo das soluções de metais, foram utilizados dicloreto de mercúrio (HgCl_2^+), do fabricante Cromoline®, e os dicloreto de níquel (NiCl_2^+), cobre (CuCl_2^+) e zinco (ZnCl_2^+), do fabricante Anidrol®, homogeneizados em água destilada autoclavada. Filtrados em membrana do tipo “Millipore” de poro $0,45 \mu\text{m}$ (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

MEIOS DE CULTIVO

O Caldo Nutriente meio não-seletivo. Para meio sólido adição de 15 g de ágar em 1 L de água destilada suplementada com as mesmas quantidades dos reagentes (KASVI, 2014). Na forma líquida, nos dois primeiros testes realizados, foram utilizados 18 litros e no teste final 12 litros devido mudança de sistema. O protótipo foi abastecido com o meio de cultura os metais pesados nas suas respectivas concentrações e amostras. O BHI (Meio Infusão de Cérebro e Coração) usada para ampla variedade de microrganismos, aeróbicos e anaeróbicos (KASVI, 2013). Foram utilizados tubos de ensaio para crescimento e isolamento do microrganismo coletado no protótipo. O Ágar Mueller Hinton possui uma substancial fonte de proteínas e carboidratos visando o crescimento de cepas bacterianas. Foram utilizadas para crescimento do microrganismo coletado do protótipo, incubado anteriormente em meio líquido BHI. O Agar MacConkey é meio diferencial e seletivo devido aos sais biliares e ao cristal violeta que inibem a maioria das espécies gram-positivas. Bactérias gram-negativas geralmente se desenvolvem bem neste meio e se diferenciam por sua habilidade em fermentar lactose (MBIOLOG, 2010). Para os meios descritos, posterior à mistura dos componentes em água destilada, devem ser autoclavados por 15 minutos a 121°C , seguido de resfriamento à temperatura ambiente.

O meio de Rugai com Lisina destina-se à identificação presuntiva de enterobactérias usado para triagem bioquímica de colônias isoladas nos meios seletivos para bacilos gram-negativos. Para procedimento técnico inocula-se com agulha bacteriológica até o fundo do tubo e estrias na superfície do meio. Incubar à $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$

por 18 a 24 horas, com tampa frouxa para permitir aeração, necessária para o desenvolvimento das reações. Realizar leitura após período de incubação (NEWPROV®).

A coloração de Gram é o método de coloração diferencial mais utilizado em exames diretos ao microscópio. Dividindo-se as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivos, retêm o corante cristal violeta; e, Gram-negativas, perdem o cristal violeta, corando-se com safranina ou fucsina (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, p. 118).

O sistema Bactray para identificação bioquímica de bacilos Gram negativos oxidase negativa (Bactray 1 e 2) ou positiva (Bactray 3), fermentadores ou não da glicose. Os valores gerados serão somados nas provas positivas, e o resultado lançado ao manual de identificação de banco de dados (LABORCLIN®, 2013). Essa prova foi realizada para confirmação do microrganismo que foi presuntivamente identificado primeiramente no meio Rugai.

TESTE INICIAL

As amostras de água (20 mL), solo e sedimentos (diluídos em uma proporção (p/v) de 1:100) foram inoculados no meio Caldo Nutriente suplementado por 4 metais: $HgCl_2^+$, $NiCl_2^+$, $CuCl_2^+$ e $ZnCl_2^+$ na mesma concentração, de 100 μM . Com o protótipo em funcionamento por 7 dias, foi realizada uma coleta do biofilme formado na parede do PVC. Para a análise, uma pequena quantidade da amostra (biofilme) foi colocada em meio de cultivo completo, seguido de incubação em estufa microbiológica por 24 horas a 37 °C. Em seguida foram confeccionadas placas em meio Ágar Mueller Hinton, para observar o aspecto macroscópico das colônias. Em seguida, a partir do inóculo bacteriano crescido, foram feitas lâminas coradas pelo método de Gram.

TESTE INTERMEDIÁRIO

Foram utilizados o $HgCl_2^+$ na mesma concentração do primeiro teste (100 μM), $NiCl_2^+$ e $ZnCl_2^+$ aumentando a concentração em 5 vezes a inicial passando de 100 μM para 500 μM . Foram realizados nas mesmas condições, meio Caldo Nutriente suplementado com as soluções de metais nas respectivas concentrações e adição além das amostras ambientais, do microrganismo isolado no teste inicial. Após novos 7 dias de funcionamento do protótipo, foram realizadas novas coletas do biofilme formado e utilizadas as mesmas técnicas microbiológicas utilizadas no teste inicial para a identificação preliminar do(s) microrganismo(s) presente(s) no biofilme.

TESTE FINAL

O teste final foi realizado com a inoculação, somente, do microrganismo isolado no teste intermediário, o qual se mostrou, no teste de coloração Gram, com o mesmo perfil do isolado no teste inicial. O objetivo deste teste é verificar se o isolado conseguirá crescer no meio Caldo Nutriente acrescido com íons de metais pesados: $HgCl_2^+$, $NiCl_2^+$, $CuCl_2^+$ e $ZnCl_2^+$ nas concentrações utilizadas por Ceylan e Ugur (2012), sendo assim, neste teste será usada a mesma concentração de $HgCl_2^+$ e os outros íons 10 vezes mais concentrados se comparar com as concentrações utilizadas no teste inicial. Após um período de 7 dias de funcionamento do protótipo, se este organismo isolado apresentar formação de biofilme, ou seja, se o microrganismo continuar se mostrando resistente, será dada continuidade com a identificação microbiológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

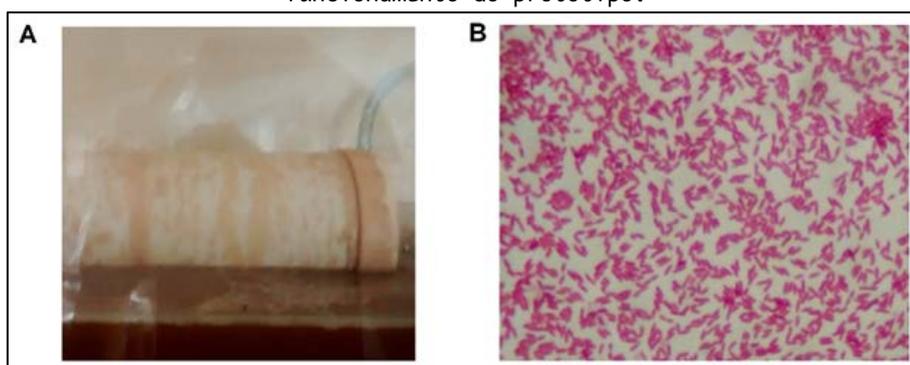
Este modelo desenvolvido do protótipo veio da inspiração pelo sistema de biodiscos utilizado em estações de tratamento de efluentes (ETEs), o qual oferece aos microrganismos uma condição aeróbia e além disso nos sistemas com biomassa aderida, a densidade do conjunto meio de cultivo líquido - superfície - biomassa é bastante

diferente da densidade quando é somente o meio de cultivo líquido no biorreator (VON SPERLING, 1997).

A escolha do uso do PVC para a superfície rotativa deve-se a um estudo de Costa e colaboradores (2001), onde o PVC apresentou melhores resultados do que o poliestireno. Além disso a velocidade de 3 rpm foi utilizada, por ser considerada uma velocidade ótima nestes sistemas de protótipos, por permitir que o meio acrescido de amostra e íons metálicos entre em contato com a superfície de forma constante e homogênea propiciando a proliferação microbiológica; eficiente homogeneização do meio e substratos; estabilidade do biofilme evitando o desprendimento de porções de biofilme aderido (DANKERT et al., 1986; PHILIPS, 2008).

Tendo em vista esses parâmetros e realizada a confecção do protótipo, foi feito o teste inicial por um período de 14 dias. Transcorridos os primeiros 7 dias de funcionamento do protótipo, uma amostra deste biofilme ainda parcialmente formado na parede da superfície PVC (Figura 4-A). Foram realizadas duas análises microscópicas em triplicata; e inoculada em meio de cultivo líquido BHI, seguido de incubação por 24 horas à 37°C, a partir deste inóculo, foram feitas placas em meio Ágar Mueller Hinton. Em seguida, a partir do pré-inóculo crescido em Mueller Hinton foram confeccionadas lâminas coradas pelo método de Gram, na qual foram observados a presença de bacilos Gram negativos (Figura 4-B).

Figura 4: A) Protótipo - formação parcial de biofilme; B) Bacilos Gram Negativos presentes em lâmina corada por Gram confeccionada com amostra coletada do biofilme formado nos 7 dias de funcionamento do protótipo.



Após os outros 7 dias restantes, um total de 14 dias de funcionamento do protótipo, foi repetida a análise microscópica do biofilme, completamente formado em toda a extensão da superfície PVC, obtendo-se o mesmo resultado (resultado não mostrado).

Para o teste intermediário, foi utilizado o microrganismo isolado no teste inicial, visando testar a sua resistência, e talvez isolar outro microrganismo diferente, foi adicionando também amostras ambientais (água, sedimento e solo/nas mesmas condições anteriores). Para tanto, foi colocado o protótipo em funcionamento mantendo a concentração do Hg²⁺, tendo em vista ser um metal considerado altamente tóxico à célula não foi visto a necessidade de aumentar sua concentração, mas, foi aumentada em 5 vezes mais a concentração dos outros íons. Com o decorrer de 7 dias de funcionamento do protótipo, foram feitas novas coletas do biofilme e realizadas técnicas microbiológicas iguais às do teste inicial, observando-se as mesmas características de Bacilos Gram Negativo isolados no primeiro teste (resultado não mostrado).

No teste final, foram utilizadas as mesmas concentrações dos metais de acordo com o Ceylan e Ugur (2012), 100 µM de mercúrio e 1000 µM de zinco, cobre e níquel (10 vezes maior à concentração do teste inicial). Estes foram adicionados ao meio Caldo Nutriente, junto com 5 mL de inóculo isolado no teste intermediário. O objetivo foi testar esse microrganismo em concentrações maiores de metais. A coleta do biofilme foi realizada após 7 dias, inoculado no meio líquido de cultivo BHI e incubado à 37 °C por

24 horas. Após o crescimento microbiano, foi semeado no meio sólido MacConkey Ágar, em duplicata. Aparentemente houve crescimento de uma única bactéria, com características de colônia com superfície convexa, de aparência cremosa, e que fermentou a lactose, deixando o meio com a coloração rosa avermelhada, como mostrado na figura 5.

Figura 5: Placa de MacConkey Ágar mostrando a fermentação do meio pelas bactérias.



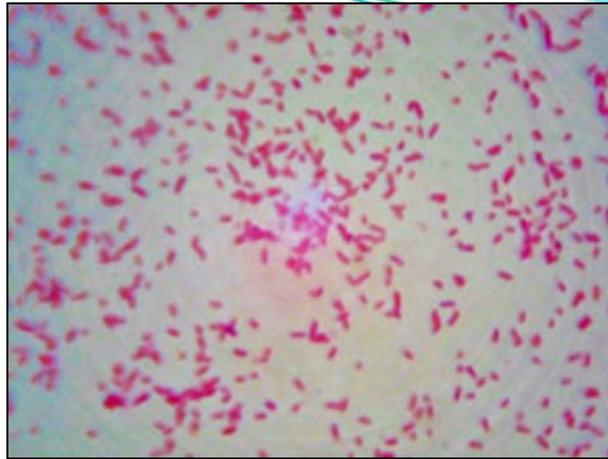
Para cultivo de uma maior variedade de microrganismos visando verificar se há algum outro possível microrganismo na amostra do biofilme coletado. Este também foi inoculado em meio Ágar Mueller Hinton e observou-se a presença de colônias, com as mesmas características macroscópicas, se tratando então de um único microrganismo (Figura 6).

Figura 6: Meio Ágar Mueller Hinton com cultivo bacteriano.



Para caracterizá-las de acordo com a sua morfologia e coloração foram realizadas lâminas coradas com a técnica de Gram, em duplicata, em que pôde ser confirmada a presença de bacilos Gram negativos (Figura 7).

Figura 7: Bacilos Gram negativos isolados no teste final.



Para uma identificação presuntiva, a partir de uma alíquota da bactéria isolada foi semeada em meio Rugai com lisina, em duplicata. Com incubação de 24 horas em estufa microbiológica à 37 °C. Após este período de incubação observamos LTD negativo, sacarose negativa, fermentação de glicose positiva, formação de gás positiva, lisina negativa, motilidade e indol positivo, como mostra a figura 8. De acordo com os resultados nenhum microrganismo se mostrou idêntico a este perfil encontrado, e de acordo com a tabela de identificação poderíamos apenas pressupor ser um *Salmonella spp.*

Figura 8: Meio Rugai com Lisina com cultivo.



Outro método conhecido como Bac tray foi realizado visando a obtenção de um melhor resultado para a identificação preliminar do microrganismo isolado neste trabalho.

Para a realização deste teste, em duplicata, foi realizada uma suspensão a partir de uma alíquota de bactéria em água destilada, pois solução fisiológica contém NaCl que interfere na leitura deste. Foi adicionado 1 mL dessa suspensão no conjunto do Kit do Bac tray 1 e 2, o 3 não foi realizado porque bacilos gram-negativos fermentadores de glicose e lactose são oxidase negativos sendo até um método de detecção para tal. Foi incubado em estufa por 24 horas a 35 °C. Após esse período foi realizada a leitura, e pôde-se observar as provas ONPG, ADH, H₂S, PD e CIT positivas no bac tray 1. No bac tray 2 as provas positivas foram, RHA, ARA, SOR, SAC, MAN e RAF, como mostrado na figura 9 (LABORCLIN®, 2013).

Figura 9: Bactray 1 e 2 constando as provas positivas.



Todos os testes foram realizados uma segunda vez em duplicata para diminuir chances de erros ou dúvidas, e como todas as provas se apresentaram sem alterações foram encerrados os testes de identificação preliminar deste estudo.

De acordo com o resultado de valor numérico obtido, foi lançado ao manual de identificação do Bactray onde foi encontrado a probabilidade de identificação, a qual demonstrou uma eficiência de 85% para *Arizona hinshawii*, que, portanto, complementou o resultado obtido anteriormente pelo meio Rugai, pois trata-se de um subgrupo das *Salmonellas*, sendo também chamada de *Salmonella arizonae*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento do protótipo de reator em escala laboratorial e operacionalmente simples, o objetivo foi atingido, pois além da confirmação do sucesso na funcionalidade do protótipo, foi isolado um microrganismo de amostras coletadas na região em estudo com histórico de contaminação, formador de biofilme e que se mostrou amplamente resistente a íons de metais pesados: $HgCl_2^+$, $NiCl_2^+$, $CuCl_2^+$ e $ZnCl_2^+$ cujas concentrações foram baseadas na literatura.

Utilizando técnicas microbiológicas com provas bioquímicas foi possível realizar identificação preliminar do microrganismo isolado como sendo gênero *Salmonella*, subgrupo *arizonae*, sendo classificada como *Arizona hinshawii*. Este microrganismo isolado, de acordo com suas características de resistência e formador de biofilme teria potencial para ser utilizado no processo de biorremediação de ambientes contaminados por metais pesados, tal qual como já se sabe este processo é uma alternativa biotecnológica viável. Porém, por ser uma linhagem patogênica não poderia ser utilizada no processo de biorremediação, pois uma das características que veta o biossorbente para o processo seria ser patogênico. Entretanto, ainda há necessidade desta identificação ser confirmada por meio de técnicas moleculares.

Por outro lado, caso seja confirmado este gênero, já está estabelecido na literatura que a *Salmonella* por conter um vasto histórico de fatores genéticos que lhe confere resistência a um amplo espectro de antibióticos, utilizando a engenharia genética, um destes fatores genéticos poderá ser clonado em linhagens bacterianas não patogênicas (BANG; CLARK; KEASLING, 2000; SILVA, 2011) resultando em linhagens transgênicas não patogênicas e resistentes a metais pesados.

Assim, poder-se-ia estar utilizando este organismo transgênico construído a partir de genes extraídos da bactéria isolada neste trabalho no processo de biorremediação de águas contaminadas por metais pesados.

Todavia este trabalho apresenta uma contribuição significativa ao processo de biorremediação, ou melhor, ao meio ambiente, principalmente no que diz respeito a água que a pouco tempo era considerada uma fonte inesgotável, e atualmente estamos cada vez mais cientes que de fato este é um bem finito.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Lusíada (UNILUS), pela confecção dos meios de cultivos, todo apoio e colaboração com este projeto.

REFERÊNCIAS

- ASSAN, M.A.C. Avaliação do desempenho de um reator biológico de discos rotativos biodiscos, no tratamento de efluentes da indústria sucroalcooleira. Departamento de Pós- Graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto. Ribeirão preto, 2006.
- BANG, S.W.; CLARK, D.S.; KEASLING, J.D. Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (phsABC) from *Salmonella enterica* serovar typhimurium in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* v.66, n.9, pag. 3939-4420, 2000.
- BARKAY, T.; SCHAEFER, J. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.4, p.318-23, 2001.
- BENNETT, P. M. Integrins and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Londres, v. 43, p. 1-4, 1999.
- BERTOLAZI, A.A, et al. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. *Natureza on line.* v.8, n.1, p. 24-31, 2010.
- BRANDA, S.S. et al. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology.* v.13, n.1, p.20-26, 2005.
- BRANDÃO, H. L. Transferência de massa no processo de biodegradação de efluentes líquidos em reatores com biofilme. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- BURATTO, A.P.; COSTA, R.D; FERREIRA, E.S. Aplicação de biomassa fúngica de *Pleurotus ostreatus* em processo de bio-sorção de íons cobre (II). *Eng Sanit Ambient.* v.17, n.4, p. 413-420, 2012.
- CETESB. Avaliação preliminar da contaminação por metais pesados na água, sedimento e organismos aquáticos do Rio Cubatão (SP). Relatório Técnico CETESB. 28 p. mais anexos.1989
- CETESB (São Paulo). Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2013 [recurso eletrônico]. Relatório Técnico CETESB. São Paulo: CETESB, 2014. 434p.
- CEYLAN, O; UĞUR, A. Bio-Monitoring of Heavy Metal Resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* Related Genus. *J. BIOL. ENVIRON. SCI.* v.6, n.18, p. 233-242, 2012.
- CHEN, A. Y. et al. Synthesis and patterning of tunable multiscale materials with engineered cells. *Nature Materials.* v.13, p.515-523, 2014. Disponível em: > <http://www.nature.com/nmat/journal/v13/n5/full/nmat3912.html> < Acesso em: 14 de out. de 2014.
- COSTA, R.H.R.; et al. Pós-tratamento de efluente anaeróbio utilizando leite fluidizado trifásico aeróbio. In: Finep. Pós-tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios. Belo Horizonte: (prosab), p. 153-164, 2001.
- COSTERTON, J.W.; et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 41, p.435-464,1987.
- COSTERTON, J. W.; et al. Pet turtles: A continuing international threat to public health. *American Journal of Epidemiology*, 132, p.233-238, 1990.
- DANKERT, J.; HOGT, A. H; FEIJEN, J. Biomedical polymers:bacterial adhesion, colonization, and infection. *Crit Rev Biocompat.* v. 2, p. 219-301,1986.

DÍAZ, M.A. et al. Plasmid mediated high-level gentamicina resistance among enteric bacteria isolate from pet turtles in Louisiana. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, p.306-312, 2006.

DONLAN, R; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, p.167-193, 2002.

KASVI. Instrução de Uso- Agar Infusão Cérebro e Coração (BHI). Rev.01. Curitiba-Paraná, 2013. Disponível em: >http://www.kasvi.com.br/pdf/62971c72310a6149d85073f4e5f456ff_arquivo.pdf<. Acesso em: 27 set. de 2014.

KASVI. Instrução de Uso- AGAR NUTRIENTE.Rev.01. Curitiba- Paraná, 2013. Disponível em: > http://www.kasvi.com.br/pdf/1e4fbc4b4856b58c036365fc3985934c_arquivo.pdf<. Acesso em: 27 set. de 2014.

KONEMAN, E.W. et al. Taxonomia das Enterobacteriaceae. In:(Org.). Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. Editora Médica e Científica Ltda. (MEDSI), 5ª Edição. p. 208-210, 2001.

LABORCLIN®. Sistema de Identificação: Bactray. Produtos para Laboratórios Ltda. Pinhais- Paraná, 2014. Disponível em: > http://www.laborclin.com.br/produtos/880100/880108_b1.pdf < Acesso em: 13 de out. de 2014.

LIU, Z. et al. Study on the Promotion of Bacterial Biofilm Formation by a Salmonella Conjugative Plasmid and the Underlying Mechanism. *Journals PLOS ONE*, v.9, n.10, 2014.

LOVLEY, D.R. & COATES J.D. - Biorremediation of metal contamination - Current Opinion Biotechnology. v.8, p.285 - 289, 1997.

LUIZ-SILVA, W., MATOS, R. H. R., KRISTOCH, G. C. Geoquímica e índice de geoacumulação de mercúrio em sedimentos de superfície do estuário de Santos-Cubatão (SP). *Química Nova*, v. 25, n.5, p.753-756, 2002.

MALCOVA, M.; KARASOVA, D.; RYCHLIK, I. *aroA* and *aroD* mutations influence biofilm formation in *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Letters*, v.291, p. 44-49, 2009.

MBIOLOG DIAGNÓSTICOS LTDA. Instruções de Uso. Agar Mueller Hinton-Mbiolog, Versão 01. Contagem- Minas Gerais, 2010. Disponível em: > http://mbiolog.com.br/produtos/Agar_Mueller_Hinton.pdf < Acesso em: 27 set. de 2014.

MELLO, J.M.M. Biodegradação dos compostos btex em um reator com biofilme. 2007. 151 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MITTELMAN, M. W. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2760-2764, 1998.

NEWPROV®. Meio de Rugai com Lisina: Meio de cultura destinado à identificação presuntiva de enterobactérias. Produtos para Laboratório Ltda. Disponível em: >http://www.newprov.com.br/uploads/bula/rugai_com_lisina_atual.pdf< Acesso em: 13 de out. de 2014.

PARREIRA, C. N. Avaliação da hidrodinâmica e da poluição no canal de Piaçaguera, no estuário de Santos- São Vicente (SP), a partir de informações ambientais e modelagem numérica. 2012. 176 f. Dissertação (Mestrado) - USP, São Paulo, 2012.

MOREIRA, N. M. Estudo sobre *Salmonella* sp. e seus mecanismos de resistência a antibióticos. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Goiânia, 2012.

- PINTO, G. A. S.; LEITE, S. G. F.; DA CUNHA, C. D.; MESQUITA, L. M. S. - Aplicação de Microorganismos no Tratamento de Resíduos: a remoção de metais pesados de efluentes líquidos. Revista Científica e Cultural da Universidade Estácio de Sá. Cap. 09, 2002.
- PHILIPS, A.M.L. Utilização de reator de biodiscos para tratamento de efluentes com altas concentrações de nitrogênio. 2008. 178 f. Tese (Programa em Pós-Graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- RIAZ-UL-HAQ & SHAKOORI, A. R. - Microorganisms resistant to heavy metals and toxic chemicals indicators of environmental pollution and their use in bioremediation. Folia Biol (Krakow). v.48, p.143 -147, 2000.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Press, 2001.
- SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. Microbiologia em Foco. n. 2, v. 1, p. 4-12. 2007.
- SHANE, S.M. et al. Salmonella colonization in commercial pet turtles (*Pseudemys scripta elegans*). Epidemiology and infection, v.105, p.307-316, 1990.
- SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRINCE, L. B. Industrial food animal production antimicrobial resistance and human health. An. Ver. Pub. Health, v.29, p.151-169, 2008.
- SILVA, K.H. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de processo de compostagem. 2011. 109 f.
- SINGH, HARBHAJAN. Mycoremediation: fungal bioremediation. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. p. 617, 2006.
- SIQUEIRA, G. W., BRAGA, E. S., LIMA, W. N. de, PEREIRA, S. F. P. Estudo granulométrico e de metais pesados (Pb, Zn e Cu) nos sedimentos de fundo do Sistema Estuarino de Santos/São Paulo-Brasil. In: Congresso brasileiro de pesquisas ambientais e saúde, 4, Anais..., Santos/SP. v.1, p.1-6, 2004.
- TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5 ed. - São Paulo: Atheneu, 2008.
- UNZ, R. F.; SHUTTLEWORTH, K.L. - Microbial Mobilization and immobilization of heavy metal. Current Opinion Biotechnology. v.7, p.307-310, 1996.
- VALLS, M.; LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for remediation of heavy metal pollution. FEMS Microbiology Reviews, v. 26, p. 327-338, 2002.
- VICTORINO, C.J.A. Planeta água morrendo de sede: Uma visão analítica na metodologia do uso e abuso dos recursos hídricos. Porto Alegre: EDIPUCRS, 231 p. 2007.
- VON SPERLING, M.V. Lodos ativados - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v. 4., Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.
- XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. Boletim de Biotecnologia. n. 76, p. 2-13, 2003.
- YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. African Journal of Biotechnology, Nigeria, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, 2007.