

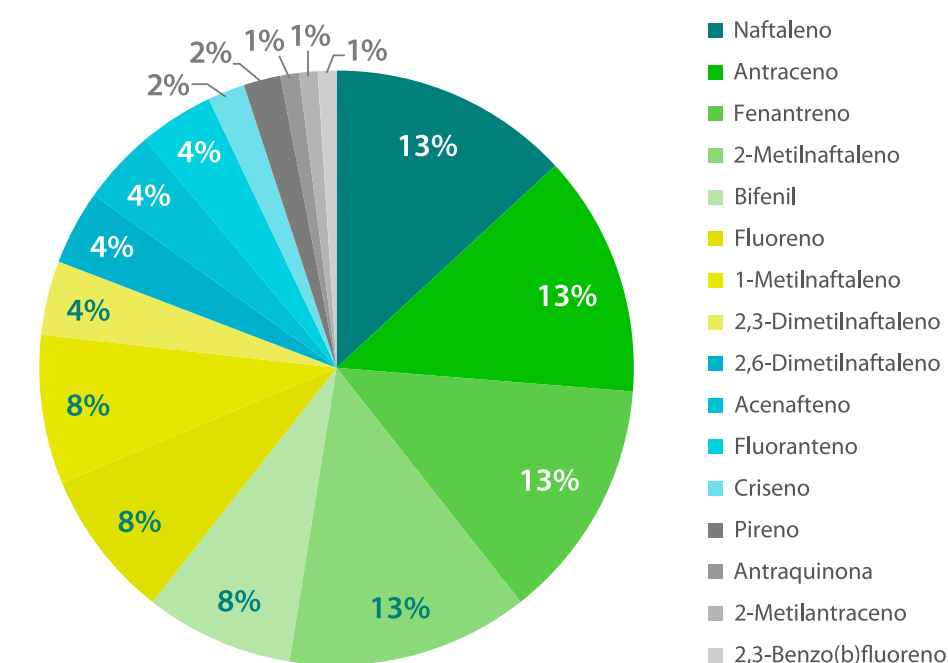
Biotecnologia agiliza soluções ambientais em campo

Utilizado em ferrovias para aumentar a durabilidade dos dormentes de madeira, o creosoto mineral é um composto quimicamente complexo, formado em média por 85% de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), 10% de compostos fenólicos e 5% de compostos heterocíclicos de nitrogênio, enxofre e oxigênio.

No passado, quando não havia nem o amplo conhecimento que se tem atualmente sobre as consequências do uso do creosoto, nem legislação ambiental sobre o tema, a Vale empregava o composto na Unidade de Tratamento de Dormentes (UTD) localizada em João Neiva, no Espírito Santo. Hoje, a empresa importa os dormentes já tratados com a substância, o que impede que haja impactos ao meio ambiente, além de realizar o controle ambiental e remediação da área onde o creosoto era antes empregado.

Em 2015, para complementar o trabalho feito pela empresa em João Neiva, iniciou-se o projeto "Pesquisas e tecnologias para biorremediação de áreas da Vale contaminadas com creosoto", levado à frente por uma equipe de pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com apoio das Gerências Executivas de Meio Ambiente e de Tecnologia e Inovação da mineradora.

Proporção de HPAs predominantes na composição do creosoto



HPA	Estrutura	HPA	Estrutura
Naftaleno		Acenaftileno	
Acenafteno		Fluoreno	
Antraceno		Fenantreno	
Fluoranteno		Pireno	
Criseno		Benzo (a) antraceno	
Benzo (b) Fluoranteno		Benzo (k) fluoranteno	
Benzo (a) pireno		Dibenzo (a,h) antraceno	
Benzo (g,h,i) perileno		Indeno (1,2,3-cd) pireno	

O creosoto contém a maioria dos HPAs incluídos na lista de poluentes orgânicos considerados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – Environment Protection Agency) como prioritários em programas de monitoramento. Quanto mais anéis aromáticos tem o composto, maior é seu potencial mutagênico e/ou carcinogênico e mais difícil é sua degradação.



Aplicação em área controlada

Guilherme Alves, analista ambiental da Gerência Executiva de Meio Ambiente que dá suporte ao projeto, assegura que “a contaminação está restrita a uma área controlada, onde não há circulação de pessoas e, portanto, riscos à população local. Apresentamos o caso de João Neiva ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) e demais órgãos ambientais para desenvolver o projeto de remediação. Durante o processo, percebeu-se a oportunidade de trabalhar com biotecnologia para otimizar o trabalho de remediação do solo e da água subterrânea de aquífero que vem sendo executado no local”.

A pesquisa é liderada pela professora Vera Lúcia dos Santos, do Departamento de Microbiologia da UFMG. Graduada em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), com mestrado em Microbiologia Agrícola e doutorado em Genética e Melhoramento pela mesma instituição, a professora fez seu pós-doutorado nas áreas de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia Ambiental pela UFMG.

Vera Lúcia já havia realizado um estudo anterior em parceria com a Vale, contemplado no edital lançado em conjunto pela empresa e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), em 2010. Esse primeiro trabalho, que gerou uma patente e tinha como foco a remoção de metais de soluções e uso de micro-organismos para degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, foi a base para o convite da empresa à equipe da UFMG, formada por nove pesquisadores.

Uma substância desafiadora

– O creosoto é formado por compostos extremamente recalcitrantes, de difícil degradação por seres vivos, algo que leva muito tempo para acontecer em condições normais. A Vale já havia contratado uma empresa para remediar a área com métodos físicos e químicos, usando inclusive equipamentos de forma pioneira para cortar e descartar adequadamente cilindros de solo contaminado, bombear o creosoto e mapear o nível de contaminação do local. Nós buscamos atuar de maneira complementar com a biorremediação, uma técnica que se

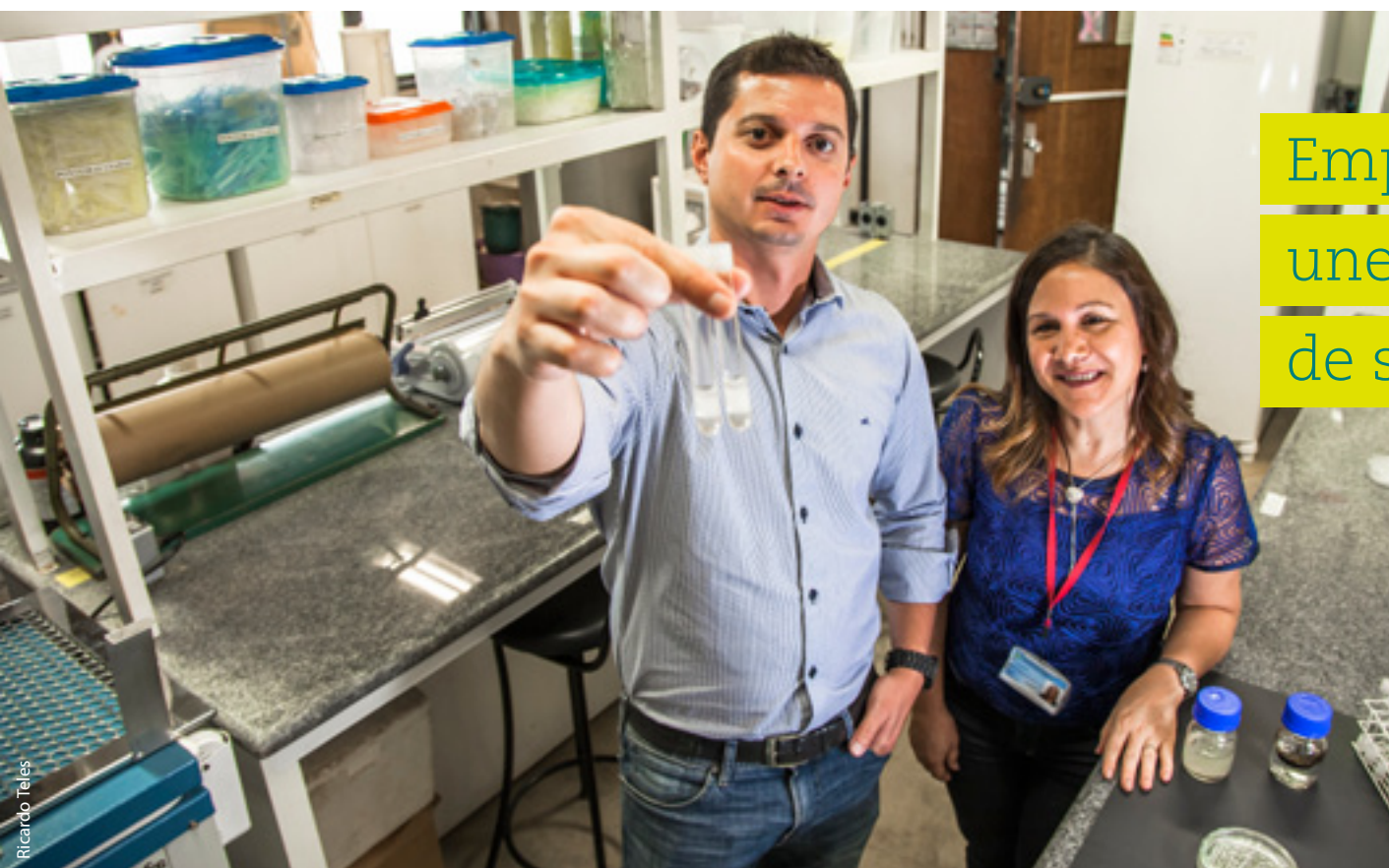
baseia na utilização de agentes biológicos ou seus produtos, como as enzimas, para a remoção de componentes tóxicos, seja por meio de adsorção, inativação ou mineralização – explica a professora.

Os micro-organismos são bastante utilizados para essa tarefa porque possuem uma grande diversidade metabólica. As bactérias, por exemplo, conseguem produzir energia por meio da oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo aqueles que existem na natureza, como celulose, amido e lipídeos, e moléculas não naturais, chamadas de xenobióticas. Os micro-organismos também são versáteis do ponto de vista fisiológico, pois crescem em ambientes com pH básico, neutro ou ácido, temperaturas altas e baixas, na presença ou ausência de oxigênio, dentre outras condições variadas.

Microbiota autóctone

Para a realização de um estudo com esse perfil, é importante primeiro avaliar se existe na área contaminada uma microbiota autóctone (do próprio local) capaz de degradar os compostos. Quando há, busca-se estimular o crescimento dos micro-organismos, adicionando oxigênio e nutrientes como fósforo e nitrogênio, entre outras medidas. Uma vez que as moléculas aromáticas dos compostos não são solúveis em água e os micro-organismos precisam disso para degradá-las, também faz parte do processo adicionar surfactantes, de origem sintética ou biológica, que são substâncias que permitem a mistura desses compostos com a água.

Quando a área não dispõe dos micro-organismos necessários para a degradação dos contaminantes, adicionam-se inoculantes – um volume expressivo de bactérias com essa capacidade. O Ibama regula e é responsável pela autorização do uso de inoculantes, comuns na remediação de lagoas eutrofizadas e solos contaminados. “É muito difícil que não existam nas áreas afetadas os micro-organismos de que precisamos, já que eles são bastante ubíquos no ambiente. No caso da Vale, se houver necessidade, serão inoculados micro-organismos isolados na área, validados em escala laboratorial e em campo e registrados no Ibama. Uma vez referendados como produtos, poderão ser aproveitados em outras áreas”, afirma Vera Lúcia.



Empresa e universidade
unem esforços na pesquisa
de solução ambiental

Guilherme Alves, da Vale, e a professora Vera Lúcia dos Santos, da UFMG



PP-20	Poços com contaminação mais elevada pelos compostos de interesse: Acenafeno (acima de 80,0 µg/L), Antraceno (acima de 7,5 µg/L), Dibenzofurano (>111,0 µg/L), Fluoreno (acima de 71,0 µg/L), Naftaleno (acima de 1500 µg/L).
PP-206	
PM-211	
PP-29	Poços com contaminação intermediária/ baixa pelos compostos de interesse:
PP-223	Acenafeno (0 a 80 µg/L), Antraceno (0 a 12,5 µg/L), Dibenzofurano (0,58 a 74,0 µg/L), Fluoreno (0 a 95,5 µg/L), Naftaleno (0 a 2500 µg/L).
PP-219	
PM-223	Poços sem contaminação pelos compostos de interesse.
PP-203	

Os poços e amostras de sedimentos foram agrupados em relação às concentrações dos contaminantes encontrados em cada uma das amostras.

Com base nessas premissas, fez-se a avaliação da diversidade microbiana, identificando as espécies e a densidade dos micro-organismos presentes na área para responder as perguntas: Quem está aonde e em que quantidade? Qual o potencial catabólico dessa microbiota autóctone?

Etapas do estudo

O estudo começou com a coleta de amostras de sedimento a partir de diferentes pontos de uma lagoa localizada na área afetada e de amostras (sólidas e líquidas) em poços de monitoramento de aquíferos instalados pela empresa responsável por sua remediação. Com base no critério para a escolha dos poços – a concentração média de diferentes compostos voláteis e semivoláteis (COV e COSV) –, definiram-se três grupos de poços em função da concentração de 31 contaminantes:

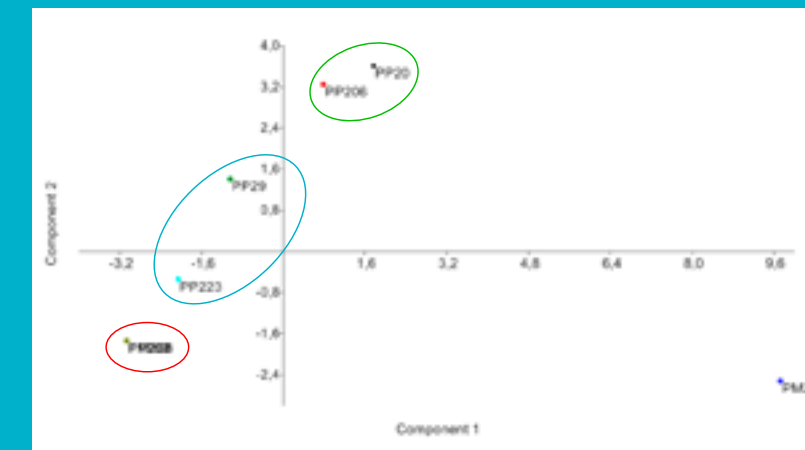
três poços com contaminações altas pela maioria dos compostos de interesse; dois poços com concentrações intermediárias; e três poços sem contaminação.

Extração de DNA e determinação da riqueza de espécies bacterianas

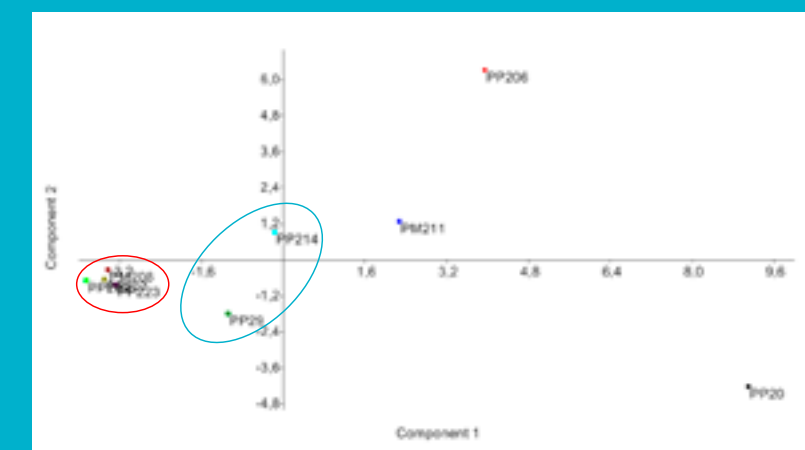
Durante o trabalho, fez-se a extração do DNA metagenômico das amostras e, a partir delas, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar as regiões V3 e V4 do gene da subunidade 16S do rRNA das bactérias, seguido de sequenciamento usando a plataforma Illumina. Este método permite a identificação das bactérias cultivadas e não cultiváveis presentes na área de estudo. E, ainda, baseada no número de sequências obtidas e programas de bioinformática, a predição da abundância relativa de bactérias por filo, classe, família e gênero. As análises possibilitaram concluir que a presença dos contaminantes alterou o perfil da comunidade bacteriana da área, promovendo o enriquecimento de diversos grupos de bactérias degradadoras de HPAs, predominantemente nas amostras com altos níveis dos contaminantes.

Em uma das etapas do estudo, determinou-se a densidade de bactérias heterotróficas totais (BHTs) e degradadoras de HPAs, fenóis e creosoto usando a técnica do número mais provável (NMP) em microplaca de 96 poços. No caso das BHTs, o cultivo foi feito usando o meio R2A. Para quantificar as bactérias degradadoras, usou-se o meio Bushnell-Haas e adição de HPAs (naftaleno, antraceno), fenol e creosoto. No geral, a densidade de BHTs diminuiu com o nível de contaminação das amostras, enquanto a densidade das bactérias degradadoras de naftaleno, antraceno e creosoto aumentou.

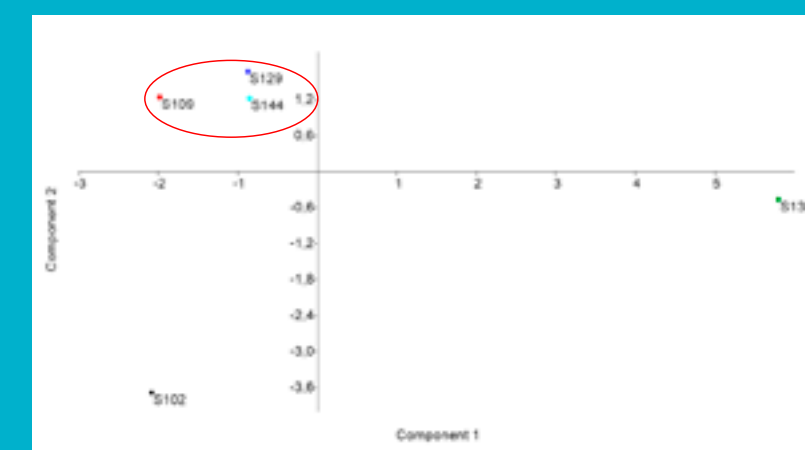
Foi medida também a densidade de bactérias e arqueas (seres procariotos semelhantes às bactérias, mas com diferenças estruturais, genéticas e bioquímicas) presentes nas amostras pelo método qPCR, por meio do qual o resultado é visualizado em tempo real durante a amplificação da sequência de interesse. Com a análise, concluiu-se que a densidade de bactérias nas amostras mais contaminadas do aquífero foi menor em relação às com menores níveis de contaminação,



Fração líquida (aquífero)



Fração sólida aquífero



Sedimento

As amostras do aquífero e sedimentos puderam ser agrupadas em diferentes "clusters" que se correlacionaram, de modo geral, com os níveis dos contaminantes, por meio da análise multivariada de componentes principais (ACP), utilizando-se o software Past.

Fragcom

Min_AO²

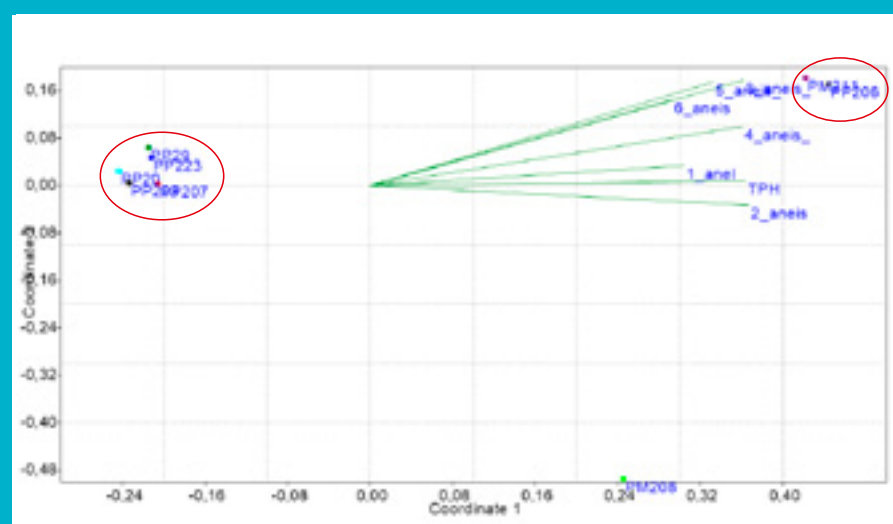
Creosoto

enquanto, para as amostras do sedimento da lagoa, não se observou variação da densidade em função dos diferentes níveis de contaminação. Além disso, as bactérias se mostraram dominantes em relação às arqueas em todas as amostras.

Isolamento, enriquecimento e perfil das comunidades

Em bancada, realizou-se o isolamento das bactérias degradadoras, a partir de amostras que passaram por processo de agitação durante sete dias, a 28° C, tendo sido enriquecidas com fenol e creosoto como fontes de carbono. Após essa etapa, obteve-se o perfil das comunidades de bactérias presentes em sedimentos e na água por meio de PCR-DGGE – técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante que possibilita a separação dos produtos de PCR (segmentos de DNA amplificados) de acordo com suas sequências de nucleotídeos.

As análises permitiram confirmar que a contaminação com o creosoto alterou a microbiota local. Nos poços onde havia maior concentração de HPAs, a comunidade microbiana era diferente na comparação com aqueles onde a concentração era pequena ou não havia contaminantes.



Análise de nMDS realizada a partir do perfil de bandas das amostras da fração líquida do aquífero no DGGE em função dos metadados, utilizando o coeficiente de Jaccard.



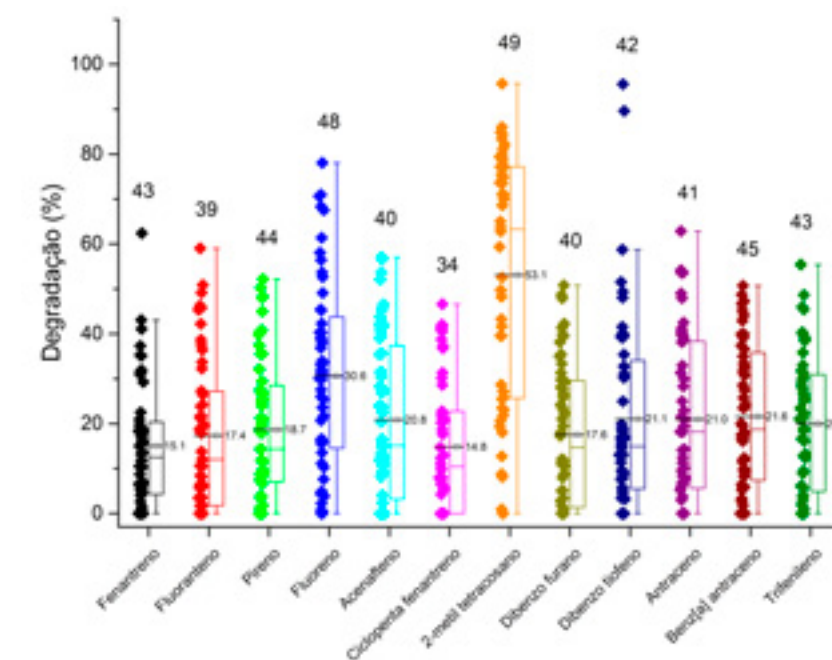
Marcos Borba, da Gerência Executiva de Meio Ambiente da Vale

Banco de isolados

Com base na técnica de enriquecimento, chegou-se a um banco de 212 bactérias potencialmente degradadoras de HPAs, fenóis e creosoto e/ou produtoras de compostos tensoativos. As bactérias pertencem a 27 generos: *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Leucobacter*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Sphingobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Comamonas*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Kosakonia*, *Nubsella*, *Pseudochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Acidovorax*, *Pandoraea*, *Diaphorobacter* e *Ralstonia*.

Conclusões

A professora Vera Lúcia afirma que, após a finalização de todas essas fases, “descobriram-se gêneros de bactérias capazes de degradar quase todos os compostos de creosoto e outros capazes de degradar HPAs específicos. Os melhores são agora nossos focos de estudo. Na parte final dos experimentos, realizada com um respirômetro adquirido com recursos do projeto, inoculamos os micro-organismos nas amostras



Porcentagem média de degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto, independentemente do isolado, e número de isolados que conseguiram degradar o composto.



Os isolados que apresentaram os melhores resultados de degradação dos 12 compostos avaliados e com maior potencial de uso para a biorremediação de ambientes contaminados com HPA estão circunscritos em vermelho.

enviadas pela Vale e adicionamos nitrogênio e fósforo para avaliar como as bactérias se comportam numa matriz próxima da realidade de João Neiva. Assim, será possível selecionar as bactérias com maior taxa de degradação dos contaminantes. Depois, o processo será feito no próprio local. Outro ganho desse estudo será criar protocolos de bioaumentação e bioestimulação em laboratório, capazes de reduzir o custo e o tempo de remediação”.

O analista ambiental Guilherme Alves complementa informando que haverá um projeto piloto, em conjunto com a empresa responsável pela descontaminação da área, para levar o resultado dos estudos para campo. E Marcos Borba, gestor de passivos ambientais da Gerência Executiva de Meio Ambiente da Vale, ressalta que “a parceria com os pesquisadores tem sido muito interessante. Fizemos um *workshop* envolvendo Vale e UFMG e temos realizado reuniões técnicas a cada três meses, proporcionando a troca de experiências e uma capacitação técnica maior de nossa equipe. A universidade foi a campo, nós fomos à universidade”.

– Não temos disciplinas que preparem para a vida corporativa. Esse tipo de pesquisa facilita e contribui para a formação de nossos alunos, além de ser uma oportunidade de dar conta de um de nossos desafios: transformar pesquisa básica em produtos e processos úteis e aplicáveis. Do ponto de vista da biotecnologia, a execução deste projeto em parceria com uma empresa do porte da Vale é importante, pois são raros os casos concretos de biorremediação levados à frente por empresas e com monitoramento sistematizado. Ser pioneira, de alguma forma, é gratificante – pontua Vera Lúcia.

“A interação entre a Gerência Executiva de Tecnologia e Inovação, os pesquisadores e a área de Meio Ambiente permitiu que do primeiro projeto, via edital, chegássemos ao segundo, de aplicação mais prática. Agora, com equipamentos laboratoriais já adquiridos, essa experiência compartilhada pode ser levada a outros locais, como a região Norte, numa terceira fase. A gestão da inovação propicia isso”, destaca Edgar Sepúlveda, analista de Desenvolvimento Tecnológico que atua na interface dos participantes. ■

Engaje-se

Você conhece outras localidades onde a biotecnologia pode ser útil para reverter passivos ambientais? Quer informações sobre esse mecanismo? Gostaria de conversar com profissionais da Vale que acompanham o estudo da UFMG? A pesquisa estará concluída em 2018 e merece ser compartilhada. Entre em contato com a equipe do projeto pelo e-mail MAIS@vale.com.

Glossário

Adsorção: Processo pelo qual átomos, moléculas ou íons são retidos na superfície de sólidos por meio de interações de natureza química ou física.

Mineralização: Processo em que uma substância orgânica é convertida em uma substância inorgânica.

Compostos voláteis: Compostos que possuem carbono na composição e temperatura de ebulição entre 50° e 260° C.

Bactéria heterotrófica: Bactéria incapaz de produzir seu próprio alimento, depende da oxidação de material orgânico previamente formado para obtenção de energia.

Polimerase: Enzima que catalisa a reação de polimerização de ácidos nucleicos a partir dos seus monômeros (nucleotídeos).

Eletroforese: Processo de migração para os eletrodos de espécies que são carregadas eletricamente em solução.

Emulsificante: Molécula que possui um grupo polar (que atrai a água) e um grupo apolar (que atrai compostos orgânicos), permitindo a interação de fases imiscíveis como óleo e água.

nMDS: Escalonamento multidimensional não métrico. Instrumento pelo qual várias tentativas são realizadas até que se obtenha uma solução aproximada para o problema.

Metagenômica: Estudo de metagenomas, material genético recuperado diretamente a partir de amostras ambientais.

Eutrofizado: Ambiente aquático com níveis aumentados de nutrientes orgânicos e inorgânicos, geralmente resultante da ação humana.