

BIORREMEDIÇÃO

Aspéctos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos

Christine Claire Gaylarde

Microbiologista, M.Sc., Ph.D., Profa. do Depto. de Biofísica, UFRGS
cgaylarde@yahoo.com

Maria De Lourdes Bellinaso

Bioquímica, M.Sc., Ph.D., Profa. do Depto. de Biologia e Química, UNIJUÍ
malou@cpovo.net

Gilson Paulo Manfio

Biólogo, M.Sc., Ph.D., Pesquisador da Natura Inovação e Tecnologia em Produtos Ltda
gilsonmanfio@natura.net

Imagens cedidas pelos autores

Biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir (remediar) poluentes no ambiente. Este processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção. Embora outras tecnologias que usam processos físicos e/ou químicos sejam também indicadas para descontaminar ambientes poluídos, o processo biológico de biorremediação é uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos.

As moléculas orgânicas de difícil degradação, denominadas “recalcitrantes”, podem ser de origem natu-

ral, sintetizadas pelo metabolismo biológico, ou sintéticas, produzidas por tecnologias industriais modernas e estranhas ao ambiente natural, por esta razão denominadas “xenobióticas” (*xenos*, do grego = estrangeiro). Estas moléculas xenobióticas, introduzidas no ambiente desde o início do século XX, compreendem vários tipos de compostos, aplicados na indústria química e de materiais, tal como agrotóxicos, corantes, fármacos, polímeros e plásticos, podendo ser tóxicas a sistemas biológicos e/ou recalcitrantes, uma vez que não fazem parte do conjunto de moléculas produzidas pelo metabolismo evolutivo que propicia a vida na Terra. Muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação resultam em efeitos nocivos e/ou mutagênicos aos organismos vivos, podendo levar à eliminação seletiva de indivíduos e acarretar modificações na estrutura ecológica e funcional da comunidade biológica.

Por estas razões há, atualmente, uma grande preocupação em se desenvolverem biotecnologias para descontaminar ambientes poluídos por xenobióticos. Os processos biológicos de descontaminação, enquadrados na categoria de biorremediação, utilizam, geralmente, microrganismos autóctones (do próprio ambiente) ou introduzidos (em estado nativo ou geneticamente modificados) com capacidade de biodegradar xenobióticos, resultando em produtos de degradação com estrutura menos recalcitrante em relação

à molécula original, ou na mineralização do xenobiótico, produzindo compostos químicos simples, como: CO_2 , H_2O , NH_3 , SO_4^{-2} , PO_4^{-2} .

Biodegradação dos xenobióticos

O sistema metabólico que se tem mostrado mais apto para biodegradar moléculas xenobióticas recalcitrantes, nos processos de biorremediação, é o microbiano, uma vez que os microrganismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando ativamente dos principais ciclos biogeoquímicos e, representando, portanto, o suporte de manutenção da vida na Terra. Esta extraordinária diversidade metabólica se deve à combinação do potencial genético individual das diferentes espécies microbianas em um sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos, e a capacidade de metabolismo integrado apresentada pela comunidade microbiana em conjunto: produtos do metabolismo de um microrganismo pode ser substrato para outros. Este intenso sinergismo metabólico entre microrganismos, praticamente ausente nos organismos mais complexos, é de fundamental importância na biodegradação de xenobióticos. Muitos fatores ambientais de natureza física, química e biológica influenciam na capacidade de um sistema microbiano de biodegradar uma

molécula.

Fatores físicos e químicos

Os principais parâmetros físicos que influenciam na degradabilidade são: natureza física da matriz onde o composto é encontrado (solo, água, sedimento), temperatura e luz. Por exemplo, ambientes complexos, tais como solos e sedimentos, têm a propriedade de, através da atração de cargas opostas, adsorver moléculas, diminuindo, desta maneira, a biodisponibilidade do poluente. Nas regiões temperadas do globo, a atividade metabólica de microrganismos pode ser reduzida em função das baixas temperaturas médias anuais, reduzindo, conseqüentemente, a taxa de degradação de poluentes nestas áreas.

Diversos fatores químicos podem influenciar, acelerando ou reduzindo, a taxa de degradação de um poluente. Entre estes fatores incluem-se a composição química da matriz ambiental, que define a capacidade nutritiva, o pH, umidade, teor de oxigênio dissolvido, o potencial redox do meio e a composição e estrutura química do poluente. Metais pesados, quando presentes, podem interagir com enzimas produzidas pelos microrganismos, inibindo a sua atividade e, por conseguinte, a capacidade degradativa destes. Por outro lado, concentrações adequadas de metais que têm ação de cofatores enzimáticos podem melhorar a capacidade degradativa do meio. A presença de outros compostos xenobióticos de estrutura simples pode também dificultar o metabolismo de moléculas mais complexas, pois a comunidade microbiana se direcionaria seu metabolismo para degradar, preferencialmente, os menos complexos.

Como exemplo da influência da estrutura química na degradação de um poluente, pode-se citar a alta persistência de compostos nitroaromáticos no ambiente. Apesar de intensos esforços, ainda não foram isoladas bactérias capazes de mineralizar muitos dos nitroaromáticos produzidos pelo homem, como, por exemplo, o TNT (utilizado em explosivos) e os herbicidas

orizalin e trifluralina. Os três compostos apresentam, em comum, três grupos nitro no anel aromático que dificultam sua mineralização.

Fatores biológicos

A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença de uma população de microrganismos capaz de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação. Não existem, na biosfera atual, rotas enzimáticas catabólicas capazes de degradar todos os compostos novos que a cultura humana sintetizou durante os últimos 100 anos. Sabe-se, entretanto, que alguns xenobióticos podem ser biodegradados por microrganismos que possuam enzimas capazes de catabolizar moléculas específicas, ou mesmo pela ação conjunta de consórcios microbianos, em que cada microrganismo atua individualmente sobre diferentes etapas do processo de biodegradação.

A biodegradação é mais provável quando a estrutura química do xenobiótico é semelhante à estrutura de moléculas naturais. Por exemplo, existe uma grande diversidade de moléculas naturais com estruturas complexas, tais como a lignina, rica em anéis benzênicos - estrutura molecular natural mais abundante na biosfera depois da glicose -, os esteróides, os terpenos e compostos halogenados naturais, que ocorrem em grande abundância e são normalmente metabolizados por microrganismos no ambiente.

As enzimas que catabolizam a degradação de compostos naturais podem apresentar baixa especificidade pelo seu substrato e, desta maneira, os xenobióticos com estrutura química semelhante a compostos naturais podem ser reconhecidos pelo sítio ativo da enzima, possibilitando, assim, que sejam quimicamente transformados. Quando o xenobiótico tem a possibilidade de percorrer todos os passos catalíticos de uma determinada rota catabólica enzimática, provavelmente ele se torna uma possibilidade nutritiva para o microrganismo, sendo os produtos de sua degradação aproveitados pelo

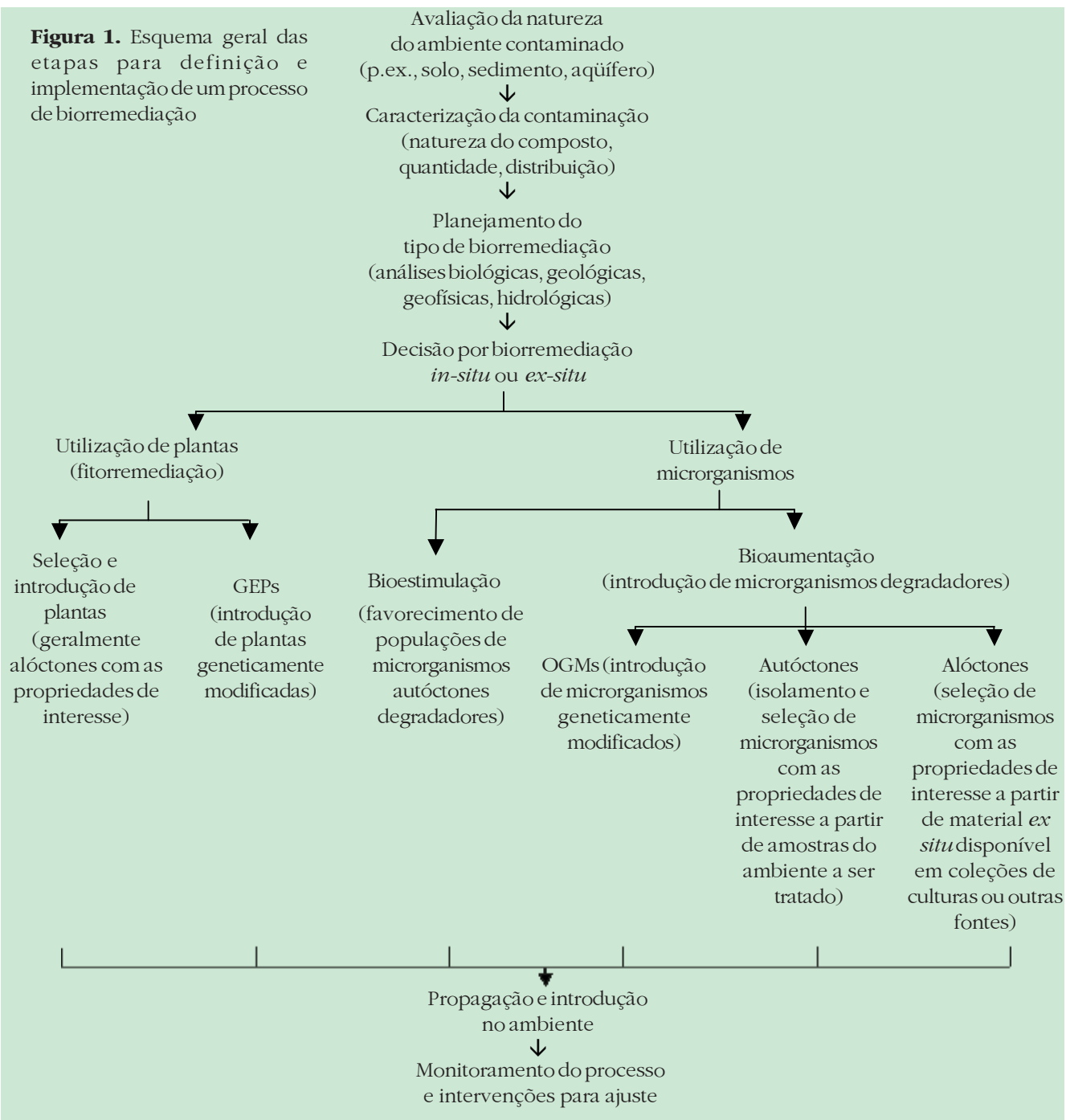
seu metabolismo construtivo e energético. Porém, quando o composto é apenas parcialmente degradado, por ação de uma ou mais enzimas de uma rota catabólica sem que o produto resultante contribua para a sobrevivência do microrganismo, esta transformação metabólica é denominada de "co-metabolismo".

O produto do co-metabolismo, muitas vezes, pode servir de substrato para transformações enzimáticas de outras espécies microbianas, possibilitando a degradação completa do xenobiótico (mineralização). O co-metabolismo, aparentemente uma transformação fútil quando analisada sob a ótica de um microrganismo isolado, tem um papel importante nas biotecnologias de remediação de sítios contaminados, pois, geralmente, nenhum microrganismo possui todas as enzimas necessárias para a metabolização completa de um xenobiótico.

Trocas de material genético podem ocorrer entre microrganismos na natureza e constituem um outro fator que contribui para o potencial biodegradador de uma comunidade. Muitas rotas catabólicas de compostos complexos estão localizadas no genoma plasmidial. Plasmídeos podem ser trocados entre bactérias de uma mesma espécie, ou mesmo entre microrganismos de espécies diferentes, através de mecanismos de conjugação ou transformação de células naturalmente competentes (células com capacidade de assimilar DNA exógeno na natureza). Estes processos de intercâmbio de material genético favorecem a disseminação de genes, e, conseqüentemente, a disseminação potencial de enzimas relacionadas ao metabolismo catabólico de uma molécula recalcitrante.

Obviamente, as características físico-químicas e nutricionais do meio externo e o compartimento intracelular microbiano estão estritamente relacionados. Mesmo que um sistema microbiano porte todos os requisitos bioquímicos e genéticos necessários para a degradação de um xenobiótico, se as características físico-químicas e componentes nutricionais do meio não condizem

Figura 1. Esquema geral das etapas para definição e implementação de um processo de biorremediação



com as necessidades metabólicas do microrganismo, a biodegradação não ocorrerá.

Visão interdisciplinar

A pesquisa técnico-científica, com o objetivo de tornar os fenômenos naturais mais facilmente compreensíveis, geralmente enfoca o estudo de parâmetros físicos, químicos e biológicos relacionados à degradação de maneira separada. Como abordado anteriormente, estes parâmetros são estritamente relacio-

nados em um processo de biorremediação. Por esta razão, a implementação de processos de remediação em um ambiente contaminado requer a condução de um estudo detalhado, com uma visão interdisciplinar, envolvendo profissionais de diferentes áreas de conhecimento, como microbiologia, bioquímica, biologia molecular, química orgânica e analítica e engenharia.

Por exemplo, é necessário um conhecimento aprofundado das características químicas da molécula

xenobiótica que se pretende eliminar em um processo de biorremediação, uma vez que a estrutura química influencia vários aspectos do metabolismo biológico. A presença de grupos químicos na estrutura molecular, como halogênios, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, CN , $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, bem como arranjos específicos destes radicais na cadeia de carbono, que interferem na distribuição eletrônica da molécula (propriedades enantioméricas ou quirais), pode dificultar a catálise enzimática, con-

ferindo à molécula maior recalcitrância. Por exemplo, os detergentes sintéticos alquilbenzeno sulfonados, comercializado nos anos 60-70, provocaram sérios impactos ambientais decorrentes de elevado grau de persistência no ambiente. Espessas camadas de espumas se acumulavam nos rios, acarretando grande mortandade de peixes. Pesquisas biológicas mostraram que a sua alta persistência no ambiente estava relacionada à presença de três grupos metilas na molécula. Um novo desenho químico da molécula, em que foram retirados os grupos metilas, permitiu o aumento da biodegradabilidade destes detergentes sintéticos, diminuindo, desta maneira, o impacto ambiental.

O grau de toxicidade de uma molécula também é relacionado com sua estrutura molecular. A estrutura molecular define o tipo e a intensidade de interação com diferentes componentes e metabólitos intracelulares (estruturas da parede e membrana celular, organelas, e estrutura terciária de proteínas e ácidos nucléicos), que podem ocasionar efeitos citotóxicos e/ou mutagênicos.

Um outro efeito importante associado à estrutura molecular que também deve ser considerado é a *biodisponibilidade* da molécula. Muitos xenobióticos têm caráter apolar, o que muitas vezes não é compatível com sítios de entrada e transportadores da membrana celular, indisponibilizando-o, desta maneira, para o metabolismo intracelular. Alguns microrganismos contornam este obstáculo produzindo surfactantes e possibilitando, assim, a entrada de moléculas apolares para o interior da célula. A busca de biosurfactantes que possam ser utilizados como aditivos em solos contaminados com compostos pouco solúveis é hoje uma das linhas com grande desenvolvimento em pesquisas de biorremediação.

Outro aspecto a ser analisado é a composição química do ambiente, a qual contribui para definição do valor nutritivo do meio. Quando o meio não fornece macro e micronutrientes necessários para o

metabolismo celular dos microrganismos degradadores, é necessária a adição controlada destes ao sistema, por meio do emprego de técnicas de engenharia, como, por exemplo, a injeção de nutrientes via galerias e/ou buracos no solo e uso de formulações de liberação lenta nos ambientes aquáticos. Como consequência destas adições, a taxa de degradação pode ser aumentada.

Técnicas de aplicação de nutrientes têm se mostrado eficientes para a despoluição de ambientes aquáticos contaminados com petróleo. Experimentos de campo demonstraram um aumento de 5 a 10 vezes nas taxas de degradação. No entanto, existem dúvidas sobre os efeitos a longo prazo, uma vez que as taxas de degradação em áreas tratadas e não-tratadas tendem a se equalizar com o tempo. A introdução de nutrientes e/ou surfactantes com o objetivo de aumentar a atividade microbiana ou a biodisponibilidade do poluente é um tipo de biorremediação conhecido como *bioestimulação*.

Outra opção que pode ser adotada para se melhorar o potencial biodegradador de um ambiente contaminado é a adição de populações de microrganismos degradadores autóctones (que já presentes naquele ambiente), ou de organismos degradadores ou mediadores de biodegradação (e.g. produtores de biosurfactantes) estranhos ao sistema (alóctones), repicados em laboratório. A utilização de técnicas para se aumentar populações microbianas degradadoras é denominada de *bioaugmentação*.

Portanto, cada processo de biorremediação é particular e quase sempre necessita de uma adequação e de uma otimização específica para aplicação em diferentes sítios afetados, requerendo sempre uma análise integrada de parâmetros físicos, químicos e biológicos.

Etapas de implementação de um processo de Biorremediação

A biorremediação é uma tecnologia complexa e sua

implementação ocorre em etapas que compreendem um estudo do ambiente, do tipo de contaminante, dos riscos e da legislação pertinente (Figura 1). Em primeiro lugar, é necessário uma caracterização do tipo e da quantidade do poluente, bem como avaliações de natureza biológica, geológica, geofísica e hidrológica do sítio contaminado.

As avaliações biológicas ocorrem, em primeira estância, em laboratório, e têm como objetivo a otimização da biodegradação do composto. Elas compreendem os testes de *bioestimulação*, pela adição de nutrientes e/ou surfactantes, e os testes de *bioaugmentação*, pela adição de culturas de microrganismos biodegradadores ou mediadores. Com base nos dados obtidos é, então, escolhida a técnica de biorremediação mais adequada para a situação e testes de campo são realizados, para verificar a eficiência do processo *in situ*.

Porém, devido à complexidade desta biotecnologia, cuja eficiência envolve vários fatores, muitos problemas de difícil equacionamento podem surgir no decorrer do processo. Entre os principais problemas encontrados na aplicação de processos de biorremediação estão:

- a poluição geralmente envolve vários compostos, de diferentes classes químicas, requerendo a seleção e utilização de diferentes microrganismos com metabolismo específico para os diferentes poluentes;
- quando as concentrações dos poluentes são baixas, os microrganismos podem não produzir as enzimas necessárias; quando são muito altas, os microrganismos podem ser inibidos;
- alguns dos poluentes presentes podem ser incompatíveis com o processo de biodegradação implementado;
- alguns compostos são rapidamente adsorvidos pelo solo, sedimento e/ou água, diluindo-se abaixo do nível exigido para a ativação da biodegradação, contudo permanecendo ainda em concentrações acima da desejável;
- a taxa da biorremediação pode ser muito baixa, resultando em um

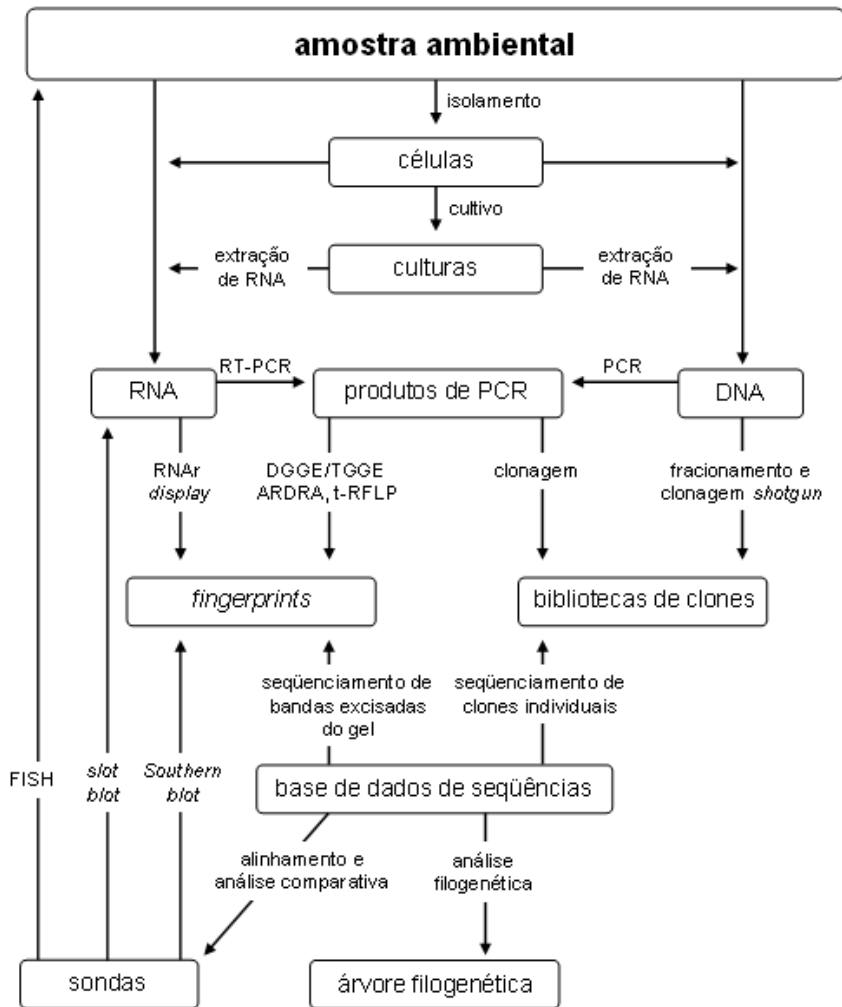


Figura 2. Possíveis estratégias de trabalho para detecção, monitoramento e caracterização da diversidade em amostras ambientais utilizando abordagens tradicionais e independentes-de-cultivo (adaptado de diferentes fontes).

processo de longa duração.

Alguns dos problemas acima relatados podem ser superados através do uso de microrganismos geneticamente modificados, os OGMs (*Genetically Engineered Microorganisms*, ou GEMs, em inglês).

OGMs na despoluição ambiental

O uso de organismos-geneticamente-modificados (OGMs) oferece a possibilidade de se contornar algumas das limitações dos processos de biorremediação, principalmente as relacionadas à taxa da degradação do poluente. A manipulação genética de um microrganismo pode permitir o aumento da taxa de degradação através de diferentes estratégias:

- inserção de genes que codificam enzimas catabólicas específicas para a molécula-alvo;

- inserção de genes que conferem resistência a compostos inibitórios no ambiente ou aos produtos de degradação da molécula-alvo;

- inserção de genes ou alterações genéticas que auxiliam na solução de problemas ligados à baixa concentração do poluente, como, por exemplo, aumento da captação/absorção do composto pela célula ou da expressão da enzima.

A incorporação destes genes em uma bactéria geralmente é feita via plasmídios ou transposons, e pode resultar na manutenção do DNA exógeno na forma de plasmídio ou na inserção dos genes no cromossomo bacteriano.

Os primeiros OGMs a serem aplicados na despoluição do ambiente foram as bactérias recombinantes desenvolvidas por Chakrabarty, nos anos 70. Através de sucessivas

recombinações entre cepas com diversos plasmídeos, foram obtidas várias linhagens de bactérias capazes de degradar mais de um tipo de hidrocarboneto. A mais conhecida foi a capaz de degradar cânfora, naftalina, octano e xileno.

Obviamente, a produção de uma bactéria capaz de degradar múltiplos poluentes em laboratório não significa a resolução completa dos problemas da biorremediação. Muitos questionamentos de ordem técnica e ética necessitam ser respondidos:

- os organismos sobreviverão no ambiente?
- eles se reproduzirão?
- eles se espalharão para outros locais?
- causarão danos ao ambiente?
- transferirão os genes para outros organismos no ambiente?

A seguir serão examinadas essas questões.

Sobrevivência

Microrganismos modificados em laboratório podem ser selecionados para apresentarem baixa competitividade com o objetivo de serem eliminados ou, ainda, para perderem as características especiais de recombinação após um certo tempo de vida, sendo, assim, pouco competentes para sobrevivência no ambiente natural.

No entanto, um dos problemas principais dos OGMs é a instabilidade de seus genes exógenos, principalmente quando inseridos em forma de plasmídios. Quando esta instabilidade é devido à segregação deficiente, ou seja, parte da população gerada após um ciclo de divisão celular pode não ter o plasmídio, o problema pode ser superado com a inserção dos genes de interesse no cromossomo bacteriano, mediante o uso de transposons. Entretanto a inserção de novos genes no cromossomo de um microrganismo pode ter efeitos inesperados, como interferência na regulação de outras vias metabólicas, acarretando, por exemplo, o aumento da produção de toxinas ou inativação da expressão de outras propriedades de interesse.

Multiplicação no local

Quando o poluente é o único substrato para crescimento microbiano, a multiplicação das células terminará na presença de baixos níveis do mesmo. Esta é uma boa maneira de controlar a população de OGMs no ambiente. Contudo os microrganismos podem perder a atividade antes que a concentração do poluente atinja o nível desejado. Este problema pode ser superado com engenharia genética, utilizando promotores induzidos pela deprivação de nutrientes. Como exemplo, podemos citar os genes T4MO (tolueno 4-monoxigenase) de *Pseudomonas mendocina* KR1, que foram clonados sob o controle do gene *groEL*. A bactéria geneticamente modificada promoveu, nas mesmas taxas, a degradação de tolueno, fenol e tricloretileno sob condições adequadas e sub-ótimas de glicose, nitrogênio e fósforo.

Riscos e dispersão dos OGMs no ambiente

Quais são os efeitos indesejáveis da liberação de OGMs no meio ambiente? Sem dúvida, conhecer os efeitos indesejáveis da inserção de organismos vivos geneticamente modificados na natureza é uma das metas mais importantes da comunidade científica atual. Entre os efeitos mais questionados estão:

- competição do OGM com a microbiota, flora e fauna local, podendo levar à extinção destas espécies nativas;
- a troca de genes entre microrganismos geneticamente modificados e populações microbianas autóctones, já cientificamente comprovada, pode levar à degradação genética das espécies autóctones;
- a possibilidade de introdução ao ambiente de espécies que apresentem fatores de patogenicidade para a população autóctone, espécies que produzem endo-e/ou exotoxinas ou que contenham genes de resistência a antibiótico; esta é uma situação que deve de ser avaliada em laboratório antes da liberação dos microrganismos no ambiente;
- o desequilíbrio da estrutura da comunidade, podendo levar à de-

gradação ambiental;

- a impossibilidade da eliminação dos microrganismos introduzidos depois que eles terminam o seu trabalho.

Grande parte destes efeitos poderiam ser contornados através do isolamento físico dos OGMs, ou seja, pelo confinamento do sítio contaminado durante o tratamento com OGMs. Porém surge uma nova questão: É possível o isolamento físico dos OGMs?

Microrganismos têm uma grande capacidade de disseminação, sendo capazes de se espalhar através do solo, na água, no vento, por colonização ou adsorção a outros seres vivos, incluindo microrganismos (protozoários, algas), pequenos animais, raízes e sementes de plantas. Por estas razões, é razoável que a resposta desta pergunta seja: “Provavelmente, na maioria dos casos, é impossível o isolamento de OGMs”. Em vista disso, é necessário que o microrganismo seja construído de maneira que seus efeitos no meio ambiente sejam mínimos e/ou seu tempo de sobrevivência seja limitado.

Avanços científicos, contudo, sugerem que OGMs no ambiente não trazem necessariamente efeitos insuperáveis. No ano 1993, no Horticultural Research International de Littlehampton, e no Institute of Virology and Environmental Microbiology de Oxford, no Reino Unido, uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens* cromossomalmente modificada foi aplicada em sementes do trigo e vaporizada nas folhas emergentes. As conclusões das investigações foram as seguintes:

- a vaporização não causou grande espalhamento do OGM nas áreas locais adjacentes aos locais de aplicação;
- *P. fluorescens* normal e recombinante causaram mudanças temporárias (de até 69 dias) na microbiota do filoplano e na rizosfera das plantas inoculadas, mas não no restante do solo, e os microrganismos mais sensíveis foram os não-formadores de esporos de cresci-

mento rápido;

- as mudanças produzidas pela introdução da linhagem recombinante não foram diferentes daquelas causadas pela não-recombinante;
- as perturbações foram pequenas, sem efeitos para o crescimento e/ou saúde das plantas.

Mesmo que estes resultados sugiram que o ambiente não tenha sido significativamente alterado, é sempre recomendado, diante das poucas evidências experimentais e práticas existentes, limitar o espaço e o tempo de vida dos OGMs. Devido à quase impossibilidade do confinamento físico dos OGMs, pesquisas, hoje, sugerem que o próprio DNA do microrganismo porte em seu código o limite de espaço físico e de tempo de vida. Por exemplo, estes atributos são contemplados quando os OGMs são construídos para sobreviverem somente em condições de poluição ou, ainda, até que um evento específico, geneticamente projetado, ocorra na fisiologia do microrganismo ou no ambiente. Um exemplo de evento geneticamente projetado é o uso dos *elementos suicidas*, tais como o gene *hok*, que controla a produção de uma proteína “killer” (assassina) nas células, ativada pela ausência de poluente. O problema do uso deste gene suicida é que pode sobreviver até 1 em 10⁴ células por geração, devido às taxas de mutações normais em estirpes suicidas negativas. Utilizando-se um sistema suicida de 2 componentes (cada um dos quais codifica um mecanismo suicida diferente), a taxa de sobrevivência cai para 10⁻⁷ a 10⁻⁸ células/geração. Entretanto, esta taxa de sobrevivência ainda pode ser considerada elevada, em função das densidades que as populações introduzidas no ambiente podem atingir. Cálculos mostram que um nível de confinamento satisfatório é atingido somente quando os organismos modificados carregam 8 mecanismos suicidas separados, cada qual com um tipo de controle diferente.

Contudo, um outro problema surge. Pesquisas mostram que o DNA, de OGMs ou, mesmo, o liberado após a morte das células podem ser

transferidos para outras células

Transferência de genes e seu controle

Os microrganismos podem transferir DNA através dos processos de conjugação (transferência de plasmídios entre células), transdução (transferência mediada por vírus) e transformação (entrada de DNA do meio em células competentes). São processos naturais, cujos mecanismos não cabem nos objetivos deste capítulo. Entretanto, cabe ressaltar que existe a possibilidade desta transferência de DNA e, conseqüentemente, dos genes de degradação ou controle, entre os OGMs e os microrganismos naturalmente presentes no ambiente.

Para evitar transferências de genes dos OGMs para populações autóctones, cientistas têm desenvolvido estratégias moleculares, como, por exemplo, vetores suicidas de confinamento que não permitem a replicação ou causam a destruição do DNA após serem transferidos para outros microrganismos.

Uma outra possibilidade para evitar a transferência de genes indesejados é optar pela utilização de genes marcadores ou reguladores que não representem riscos de danos ao ambiente. Por exemplo, genes de resistência a antibióticos, comumente utilizados como marcadores de OGMs, podem ser substituídos por genes marcadores de resistência a sais de Hg, arsenito, telurito, herbicidas, ou outros marcadores que não apresentem risco ambiental.

Deteção de microrganismos e genes de degradação no ambiente

A introdução de microrganismos, sejam eles OGMs ou não, e/ou a utilização de estratégias que favoreçam o aumento de populações microbianas específicas em um dado ambiente para fins de biorremediação requer, necessariamente, a adoção de práticas de monitoramento microbiológico voltadas para a deteção e/ou quantificação de microrganismos e/ou dos genes intro-

duzidos no ambiente. Este tipo de prática pode visar diferentes objetivos, ligados direta ou indiretamente à atividade de degradação desejada:

- quantificar a população dos microrganismos de interesse, ligados ao processo de degradação do poluente ou xenobiótico;
- avaliar a disseminação de OGMs e não-OGMs introduzidos no ambiente;
- avaliar a possibilidade de transferência dos genes para comunidades microbianas locais, e, ainda;
- fornecer informações valiosas para avaliação de possíveis impactos ambientais da introdução ou do favorecimento de populações específicas, refletido em alterações na composição e estrutura de comunidades microbianas naturais do sítio.

Diferentes estratégias podem ser adotadas para a realização destes monitoramentos. Os métodos experimentais utilizados podem ser divididos, basicamente, em dois grandes grupos, de acordo com a abordagem que é empregada:

• **métodos baseados em isolamento e cultivo:** o monitoramento é realizado utilizando-se protocolos convencionais de microbiologia, baseados no isolamento dos microrganismos da amostra ambiental e inoculação em meios de cultivo seletivos e/ou não-seletivos, avaliando os resultados através do crescimento de colônias em placas de Petri ou em ensaios de diluição utilizando tubos múltiplos, e;

• **métodos independentes-de-cultivo:** o monitoramento de linhagens microbianas e/ou de grupos microbianos específicos na amostra é realizado através da análise de células e/ou ácidos nucléicos extraídos da amostra, utilizando-se sondas moleculares para genes determinados ou a amplificação destes por metodologias de PCR.

Dependendo da estratégia de biorremediação utilizada, do tipo de amostra e ambiente alvo, os métodos de cultivo podem ser facilmente empregados e fornecer parâmetros adequados para avaliação das populações de microrganismos biodegradadores e aspectos gerais das populações microbianas na amos-

tra. No caso de sítios e estratégias de biorremediação onde populações microbianas altamente diversificadas são favorecidas (alta diversidade de espécies envolvidas no processo), onde existam fatores limitantes ao cultivo, como presença de compostos recalcitrantes altamente tóxicos ou amostras de difícil coleta e manipulação (subsolo, aquíferos profundos, resíduos industriais tóxicos), em casos onde os OGMs introduzidos não são diferenciáveis de populações naturais por cultivo, os métodos baseados em isolamento e cultivo não são adequados para o monitoramento. Nestes casos, o uso de métodos independentes-de-cultivo podem representar uma alternativa mais eficaz e eficiente para o monitoramento.

Os métodos independentes-de-cultivo, por sua vez, permitem a deteção e monitoramento tanto dos microrganismos específicos como dos genes de degradação relacionados ao processo de biorremediação. Dentre os métodos mais utilizados para deteção específica de microrganismos e genes podemos citar a hibridização com sondas moleculares em ensaios de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) ou em membrana de nylon (*dot blot*), e a amplificação dos genes-alvo em reações de PCR.

Uma representação de diferentes possíveis estratégias e metodologias que podem ser empregadas em um estudo de populações microbianas em amostras ambientais é apresentada na Figura 2. O detalhamento destes métodos e apresentação de protocolos não são objetos deste capítulo. Porém, como estes são amplamente difundidos, é fácil a localização de trabalhos na literatura que relatam a aplicação de diferentes estratégias moleculares ao estudo de processos de biorremediação.

Algumas estratégias e metodologias independentes-de-cultivo podem ser utilizadas para uma caracterização fina das comunidades microbianas presentes na amostra e populações específicas. A amplificação de genes ribossomais utilizando iniciadores (*primers*) grupo- ou es-

pécie-específicos permite a visualização de padrões de bandas representativos da comunidade estudada em análises eletroforéticas, como no caso do DGGE/TGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis* e *thermal gradient gel electrophoresis*), métodos que permitem a separação de fragmentos de mesmo tamanho, porém com seqüências gênicas diferentes, e do ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) ou t-RFLP (*terminal fragment length polymorphism*), métodos que permitem a diferenciação de microrganismos nas amostras pela análise do padrão de bandas gerados por restrição enzimática do DNA amplificado.

Por outro lado, a construção de bancos genômicos, produzidos a partir da clonagem dos fragmentos de genes ribossomais (ou de outros genes de interesse, incluindo genes codificadores de enzimas de vias catabólicas), amplificados por PCR, permite a geração de material para seqüenciamento de DNA e análise posterior filogenética de seqüências de DNA ribossomal e proteínas.

A aplicação de métodos moleculares geralmente implica em custos mais elevados, comparado com a utilização de protocolos tradicionais baseados em isolamento em cultivo. Contudo, métodos independentes-de-cultivo permitem a geração de dados com elevado conteúdo de informação e de natureza complementar aos métodos microbiológicos tradicionais, possibilitando a detecção e quantificação de OGMs e microrganismos não-modificados também pela presença dos genes de degradação no DNA e pelo nível de atividade metabólica (quantidade de RNA intracelular) presente na célula. Na Figura 2 observa-se relacionamento entre as técnicas que podem ser utilizadas nos estudos tradicionais e moleculares de amostras ambientais.

Referências Bibliográficas

Alexander, M. (1999). **Biodegradation and bioremediation**. 2nd

ed. New York: Academic Press. 453 pp.

Amann, R.I.; Krumholz, L.; Stahl, D.A. (1990). **Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology**. *Journal of Bacteriology* v.172, p. 762-770.

Amann, R.I.; Ludwig W.; Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews** v.59 (1), p. 143-169.

Atlas, R.M.; Bartha, R. (1998). **Microbial ecology**. 4th ed. Menlo Park: The Benjamin/Cummings. 533 pp.

Borém, A.; Santos, F.R. (2004). Biorremediação. In: Borém A.; dos Santos, F.R. (Eds) **Biotecnologia simplificada**. Universidade Federal de Viçosa/MG, p. 179-187.

Crawford, R.L. (Eds). (2002). Bio-transformation and biodegradation. Section VIII. In: Hurst, C.J.; Crawford, R.L.; Knudsen, G.R.; McInerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. (Eds.) **Manual of environmental microbiology**. 2nd ed. ASM Press, Washington DC. p. 898-1094.

Fernandes, F.M. (1998). Bioremediation – State of the art. In: **Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium**. Florianópolis, 27-30 Abril.

Glazer, A.N.; Nikaido, H. (1995). **Microbial biotechnology**. New York: W.H. Freeman. 662 pp.

Grimberg, S.J.; Aitken, M.D. (1995). Biodegradation of phenanthrene solubilized in surfactant micelles. In: Hinchee, R.E.; Brockman, F.J.; Vogel, C.M. **Microbial process for bioremediation**. Columbus: Battelle Press. p. 59-66.

Leung, K.; Errampalli, D; Cassidy, M.; Lee, H.; Trevors, J.T.; Okamura, H.; Bach, H.J.; Hall, B. (1997). A case study of bioremediation of

polluted soil: biodegradation and toxicity of in soil. In: van Elsas, J.D.; Trevors, J.T.; Wellington, E.M.H. (Eds.). **Modern soil microbiology**. Marcel Dekker, New York. p. 577-605.

Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (1997). **Microbiologia ambiental**. Embrapa-CNPMA. 440 pp.

Melo, I.S.; Souza Silva, C.M.M. (2003). Biorremediação de solos poluídos. In: Borém, A.; Santos, F.R.; Almeida, M.R. (Eds.). **Biotecnologia de A a Z**. Universidade Federal de Viçosa/MG, p. 95-125.

Spain, J.C.; Hughes, J.B.; Knackmuss, H.-J. (2000). **Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives**. New York: Lewis Publishers. 434 pp.

Spilborghs, M.C.F.; Casarini, D.C.P. (1998). Biorremediação do solo contaminado com compostos orgânicos. **Revista Meio Ambiente Industrial** v. 12, maio-junho, p. 66-69.

Trevors, J.T.; van Elsas, J.D. (Eds.) (1995). **Nucleic acids in the environment: methods and applications**. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. 256 pp.

Whyte, L.G.; Bourbonnière, L.G.; Bellerose C.G.; Greer, C.W. (1999) Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the high Arctic. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 69-79.

Yarden, O.; Salomon, R.; Katan, J.; Aharonson, N. (1990). Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 15-23.

Zarda, B.; Hahn, D.; Chatzinotas, A.; Schönhuber, W.; Neef, A.; Amann, R.; Zeyer, J. (1997). **Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization**. *Archives of Microbiology* v. 168, p. 185-192.