

Tema 2

Biorremediação



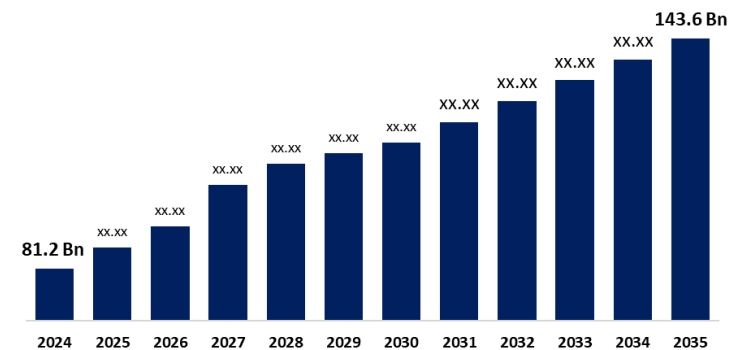
Óleos vegetais

Os óleos vegetais são obtidos a partir de sementes, frutos ou nozes que contêm lípidos, através de diferentes métodos de prensagem, extração com solvente ou uma combinação destes.

Existem inúmeros óleos vegetais derivados de diversas fontes. Entre eles, destacam-se os óleos vegetais mais populares: os principais óleos de oleaginosas – soja, algodão, amendoim e girassol; e outros como o óleo de palma, óleo de palmiste, óleo de coco, óleo de rícino, óleo de canola e outros.



United States Vegetable Oil Market Size



Impactos ambientais da contaminação por óleos vegetais

Um único litro de óleo pode poluir até 1 milhão de litros de água, impermeabilizar o solo, entupir canalizações e emitir metano.

Impactos Ambientais

- **Água:** Forma uma película à superfície, impedindo a entrada de luz e oxigénio, o que provoca a morte de peixes e fitoplâncton. Pode contaminar lençóis freáticos e atingir rios e mares.
- **Solo:** Impermeabiliza o solo, impedindo a infiltração de água (aumentando o risco de inundações) e prejudicando a respiração da biota do solo (ex: raízes das plantas, microfauna do solo, microbiota).
- **Saneamento:** Ao arrefecer nas tubagens, solidifica e adere às paredes, provocando entupimentos, cheiros desagradáveis e transbordos de esgoto.
- **Clima:** A decomposição do óleo no meio ambiente liberta gás metano (CH_4).



Impacto económico da contaminação por óleos vegetais

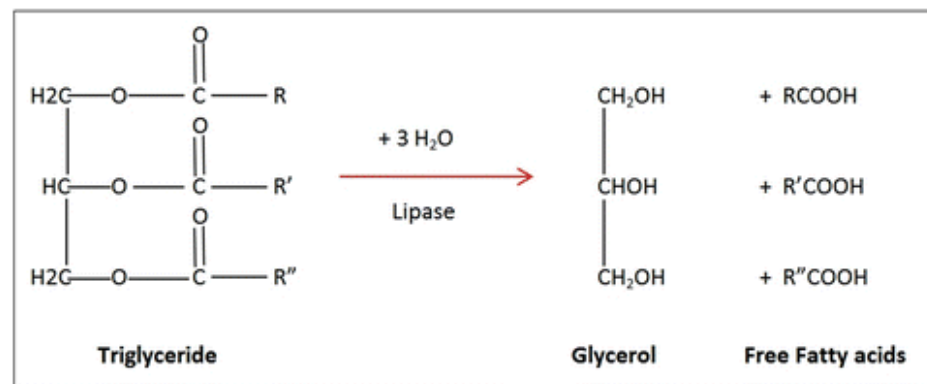
- A presença de óleos alimentares usados em redes de drenagem aumenta custos de tratamento de água em **até ~25 %**, devido à maior carga poluente e manutenção nas estações ETAR.
- Em Portugal, cerca de **35 000 toneladas de óleos acabam nos esgotos por ano**, com grande parte não sendo recolhida seletivamente, aumentando custos ambientais e operacionais.
- Cada litro de óleo descartado inadequadamente pode contaminar até **1 000 000 L de água**, impactando ecossistemas e elevando custos de tratamento e recuperação ambiental.
- O mercado global de óleos residuais tem um valor económico estimado em **>US\$ 13 bilhões (2024)**, mostrando que estes resíduos têm potencial económico quando corretamente valorizados.

Como resolver o “problema” das contaminações?

Biodegradação (microbiana) de óleos vegetais

Biodegradação é o processo pelo qual as substâncias orgânicas são decompostas pelas enzimas produzidas pelos organismos vivos. O termo é frequentemente utilizado em relação à ecologia, gestão de resíduos e remediação ambiental (biorremediação).

A matéria orgânica pode ser degradada aerobicamente, com oxigênio ou anaerobicamente, sem oxigênio. Um termo relacionado com a biodegradação é a biomineralização, em que a matéria orgânica é convertido em minerais.



Quando existe uma **aplicação intencional da biodegradação para reduzir contaminantes no ambiente**, trata-se de **biorremediação**!

Vias metabólicas envolvidas na biodegradação de óleos vegetais

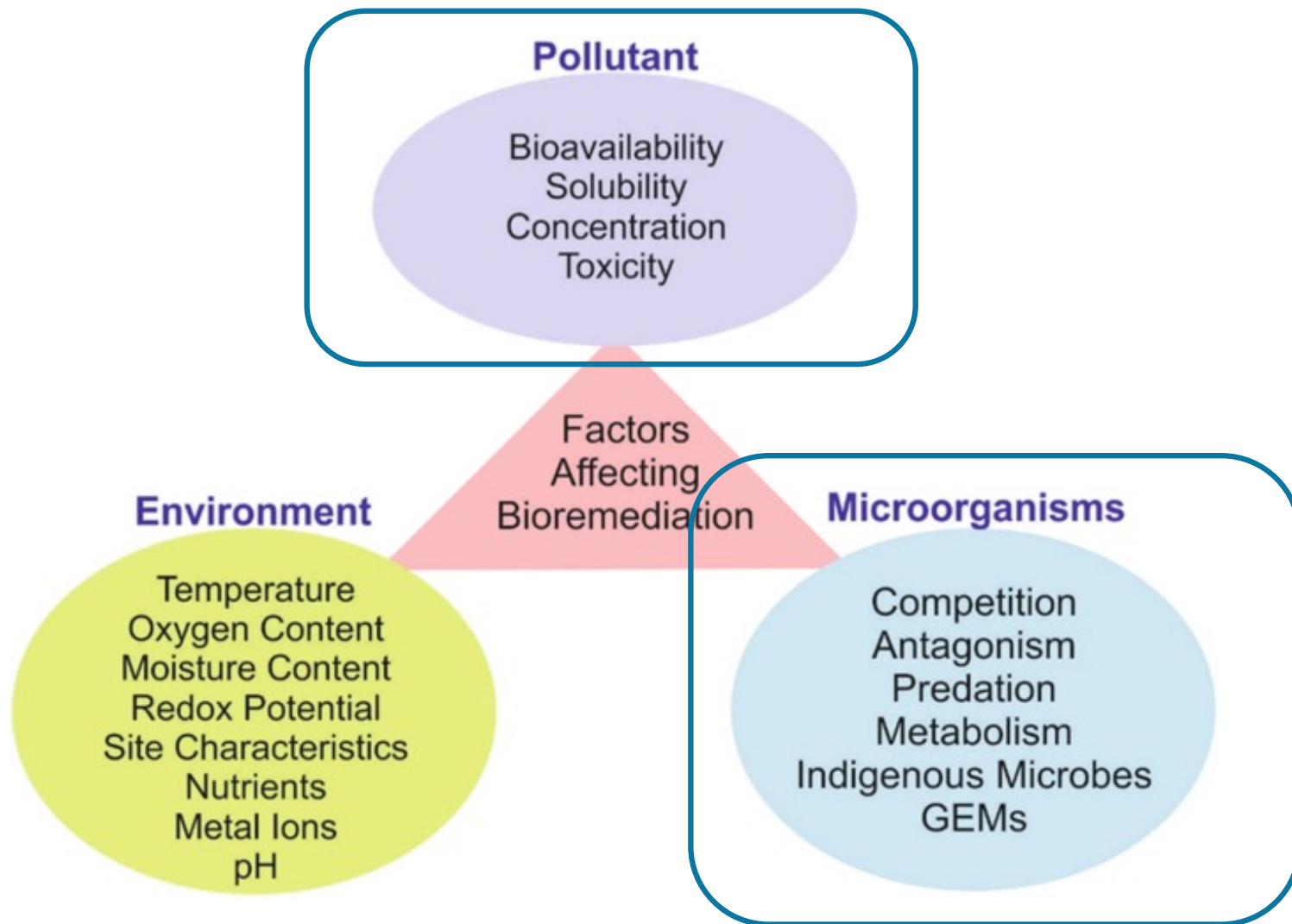
1. Hidrólise Extracelular: Como os óleos vegetais são moléculas hidrofóbicas grandes, as bactérias excretam **lipases extracelulares** (como a triacilglicerol lipase) para quebrar as ligações éster dos triglicéridos. Os produtos formados incluem glicerol e ácidos gordos livres. **Papel dos Biosurfactantes:** Muitas bactérias, como as do género *Pseudomonas*, produzem biosurfactantes (ex: ramnolípidos) para emulsionar o óleo, aumentando a área de superfície para a ação enzimática.

2. Catabolismo dos Componentes Hidrolisados: após a entrada na célula, o glicerol e os ácidos gordos seguem caminhos distintos:

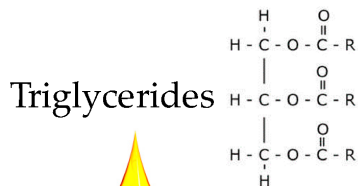
- (i) Via do Glicerol: O glicerol é convertido em **glicerol-3-fosfato** (pela enzima glicerol quinase) e depois em fosfato de dihidroxiacetona, entrando na Glicólise ou Gluconeogénese para produzir energia ou açúcares estruturais.
- (ii) Via da β -Oxidação: Os ácidos gordos são ativados em Acil-CoA e sofrem ciclos repetitivos de **β -oxidação**. Este processo fragmenta as cadeias de carbono em unidades de **Acetil-CoA**.

3. Metabolismo Central

- Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA): O Acetil-CoA entra no Ciclo de Krebs para oxidação completa, gerando CO_2 , água e eletrões para a cadeia respiratória.
- Via do Glioxilato: Essencial quando os óleos são a única fonte de carbono. Esta via permite que a bactéria converta Acetil-CoA em precursores de 4 carbonos (como o succinato) para a síntese de glucose.



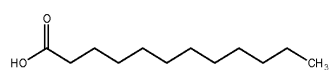
Major components in vegetable oils



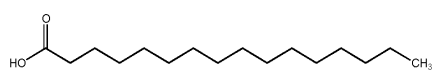
Saturated fatty acids

Mono-unsaturated fatty acids

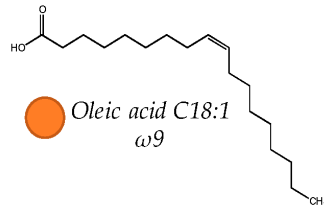
Poly-unsaturated fatty acids



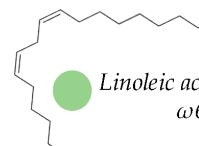
Lauric Acid C12:0



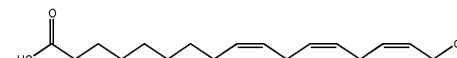
Palmitic Acid C16:0



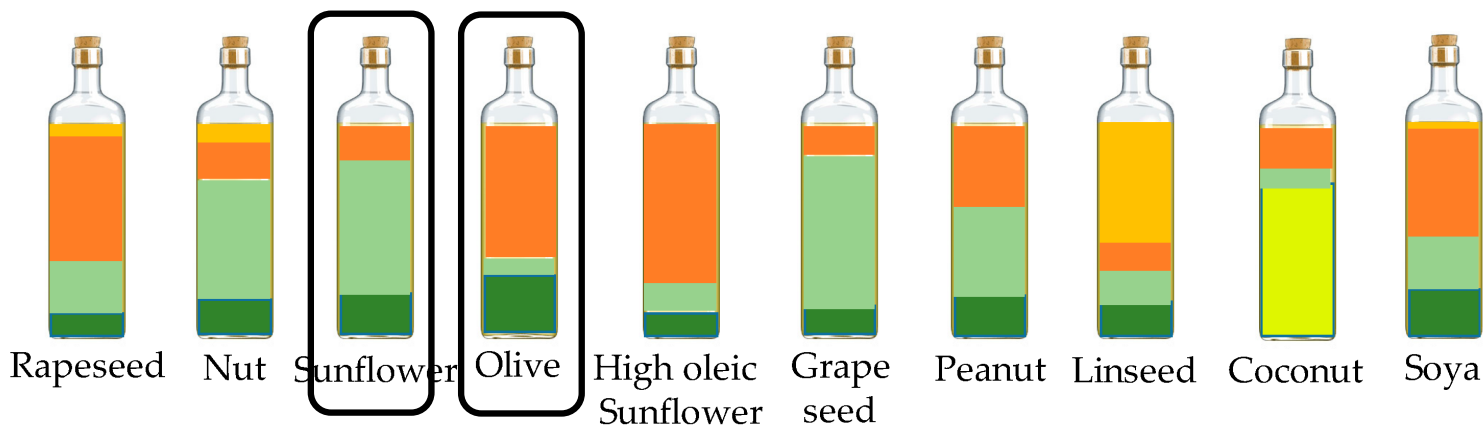
Oleic acid C18:1
ω9



Linoleic acid C18:2
ω6



Linolenic acid C18:3
ω3



Yara-Varón et al 2017 (doi:10.3390/molecules22091474)

Objetivos

Avaliação do potencial de biorremediação de óleos vegetais por estirpes bacterianas isoladas de sapal

- Avaliar crescimento bacteriano em meio mineral suplementado com azeite ou óleo vegetal
- Comparar culturas individuais e co-culturas
- Avaliar indiretamente potencial lipolítico através do crescimento em substratos hidrofóbicos
- Comparar crescimento em óleos com controlo positivo em glucose

Métodos de rastreio em meio sólido



Zona de Clarificação (Halos): Utiliza-se um meio de agar mineral suplementado com o óleo vegetal de interesse (emulsificado). As bactérias que degradam o óleo produzem enzimas (lipases) que quebram as gorduras, criando um **halo transparente** ou zona de clarificação em redor da colónia.



Agar Tributirina (TBA): É um dos meios sólidos mais utilizados para identificar atividade lipolítica. A tributirina é um triglicérido simples que torna o agar opaco; a sua degradação pelas bactérias resulta em zonas claras visíveis ao redor do crescimento bacteriano.

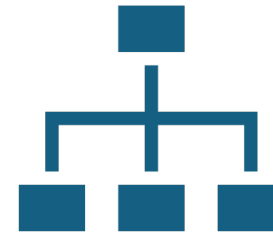


Agar com Indicadores de pH: Como a degradação de óleos liberta ácidos gordos, a descida do pH pode ser detetada adicionando indicadores coloridos (como o azul de bromotimol ou vermelho de fenol) ao meio sólido, que mudam de cor conforme o óleo é biodegradado.

Vantagens e Limitações do rastreo em meio sólido



Vantagens: É um método rápido, visual e ideal para processar um grande número de amostras simultaneamente para identificar quais as bactérias que têm potencial de degradação.



Limitações: O meio sólido é excelente para **qualificação** (sim/não) mas para **quantificação** exata da taxa de degradação (por exemplo, via HPLC ou Cromatografia Gasosa). Para uma análise quantitativa, utilizam-se meios líquidos para permitir a extração e análise química do óleo residual.

1. Princípio do método experimental

-
- O método **simula condições de contaminação ambiental** com óleos vegetais e permite quantificar a **biodegradação indireta pelo crescimento microbiano**.
 - A utilização de **placas com meios M9** suplementados com óleo garante que apenas microrganismos capazes de degradar o óleo crescerão, tornando o método seletivo.
 - A utilização de **placas com meios M9** suplementados com glucose constitui um control positivo.

2. Microrganismos

-
- Estirpes de bactérias isoladas em ambiente de sapal:
 - Estirpe 24, isolada de solos
 - Estirpe 179, isolada de raízes
 - Estirpe 214, isolada de raízes
 - Cada estirpe testada separadamente
 - Em co-cultura

3. Protocolo para cada grupo

-
- Testar a capacidade de decomposição de material vegetal em:

2 estirpes de bactérias e em co-cultura

2 óleos vegetais (azeite e óleo de girassol) + controlo positivo (glucose)

1 réplica

1 temperatura

3.1. Inoculação (23 de março)

-
1. Transferir 1 mL de solução salina estéril para microtubo.
 2. Suspende colónias bacterianas em solução salina.
 3. Homogeneizar em vórtex.
 4. Ajustar a turbidez para aproximadamente 1,0 McFarland.
 5. Preparar as seguintes condições:
 - Sa
 - Sb
 - Co-cultura (Sa + Sb, volumes iguais)
 6. Inocular 4 aliquotas separadas de 20 µL de cada inóculo.
 7. Incubar a 28 °C.
- Cada grupo deverá testar ambas as fontes lipídicas.

3.2. Avaliação (31 de março)

-
- Crescimento bacteriano (diâmetro de colónias)
 - Aspeto da emulsão à volta da colónia
 - Zonas de clarificação ou halos de emulsificação (atividade lipolítica)
 - Diferenças entre culturas individuais e co-cultura
 - Comparação entre azeite e óleo de girassol
 - Comparação com controlo positivo

Desafio



Planificação das etapas da pré-aula:
preparação dos meios de cultura
organização experimental

Como preparar os meios de cultura?

Sugestões?

Que materiais, equipamento e reagentes são necessários para este trabalho?

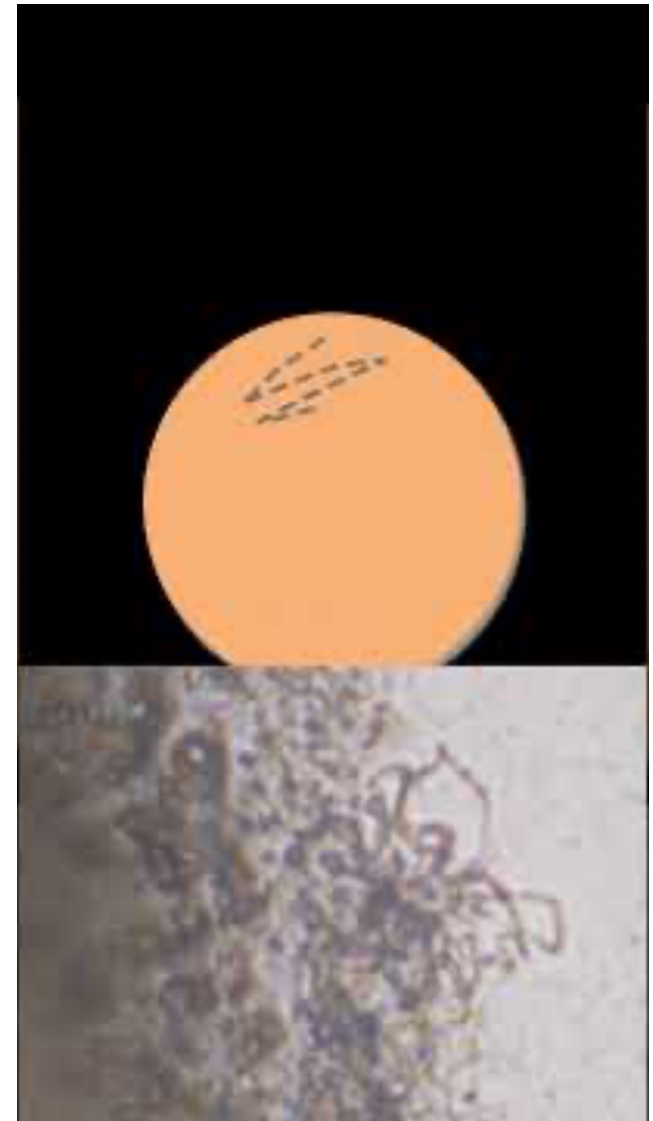
Listar

Síntese final:

- Relacionar crescimento microbiano com metabolismo lipídico
- Identificar limitações metodológicas
- Discutir criticamente resultados qualitativos
- Propor melhorias experimentais
- Contextualizar os dados num cenário real de biorremediação

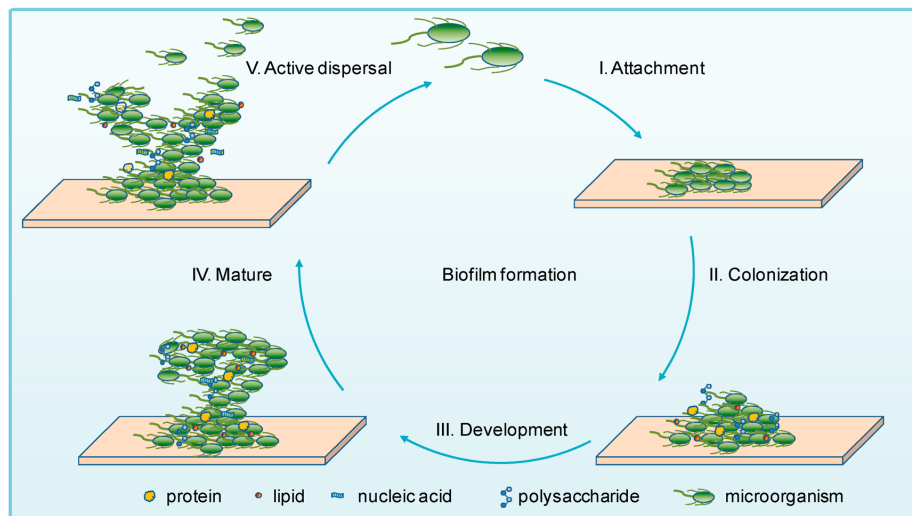


Outras características
microbianas que
potenciam a capacidade
de degradar óleos
vegetais



Tema 3

Biofilmes



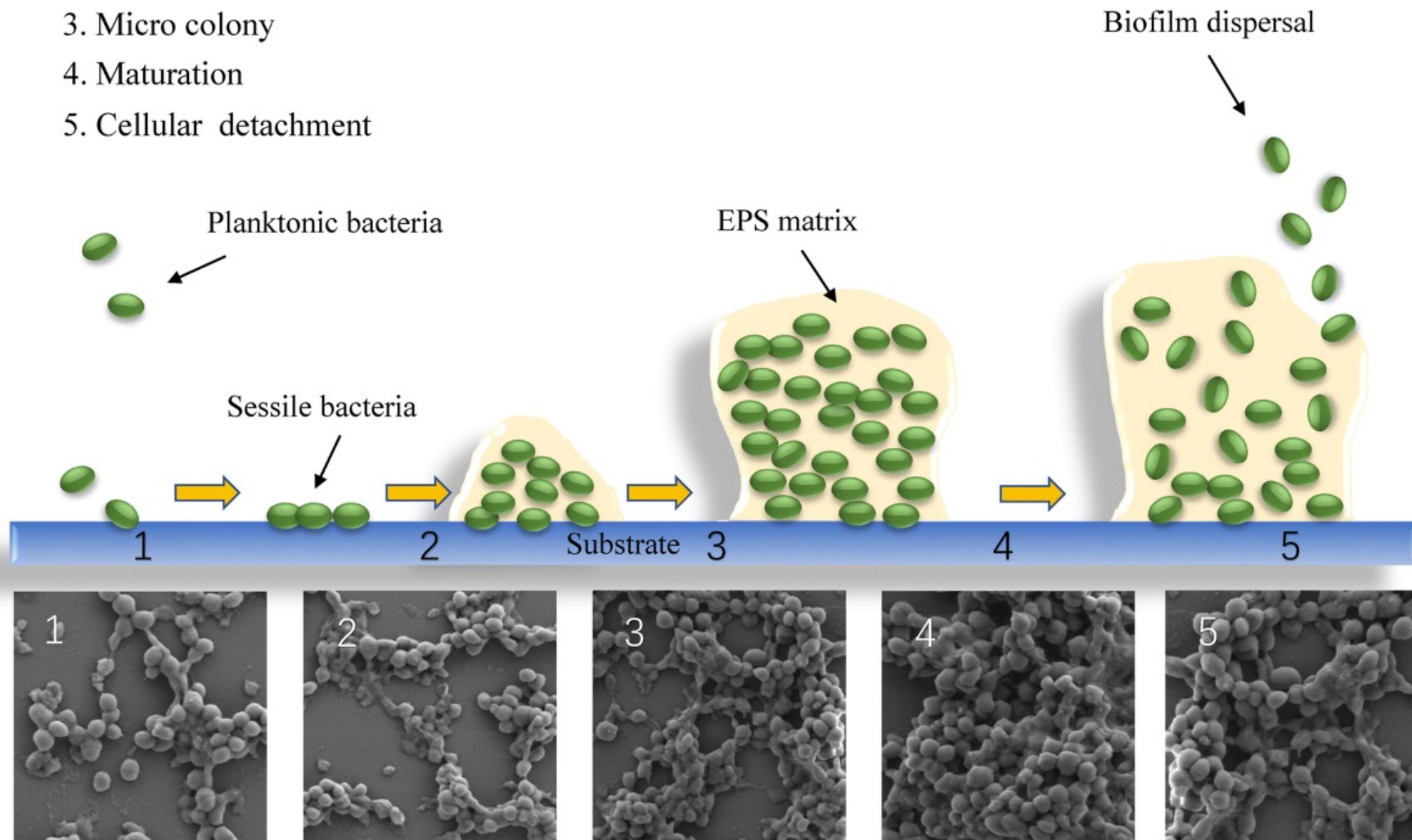
Os microrganismos existem nos biofilmes que se associam a superfícies bióticas e abióticas.

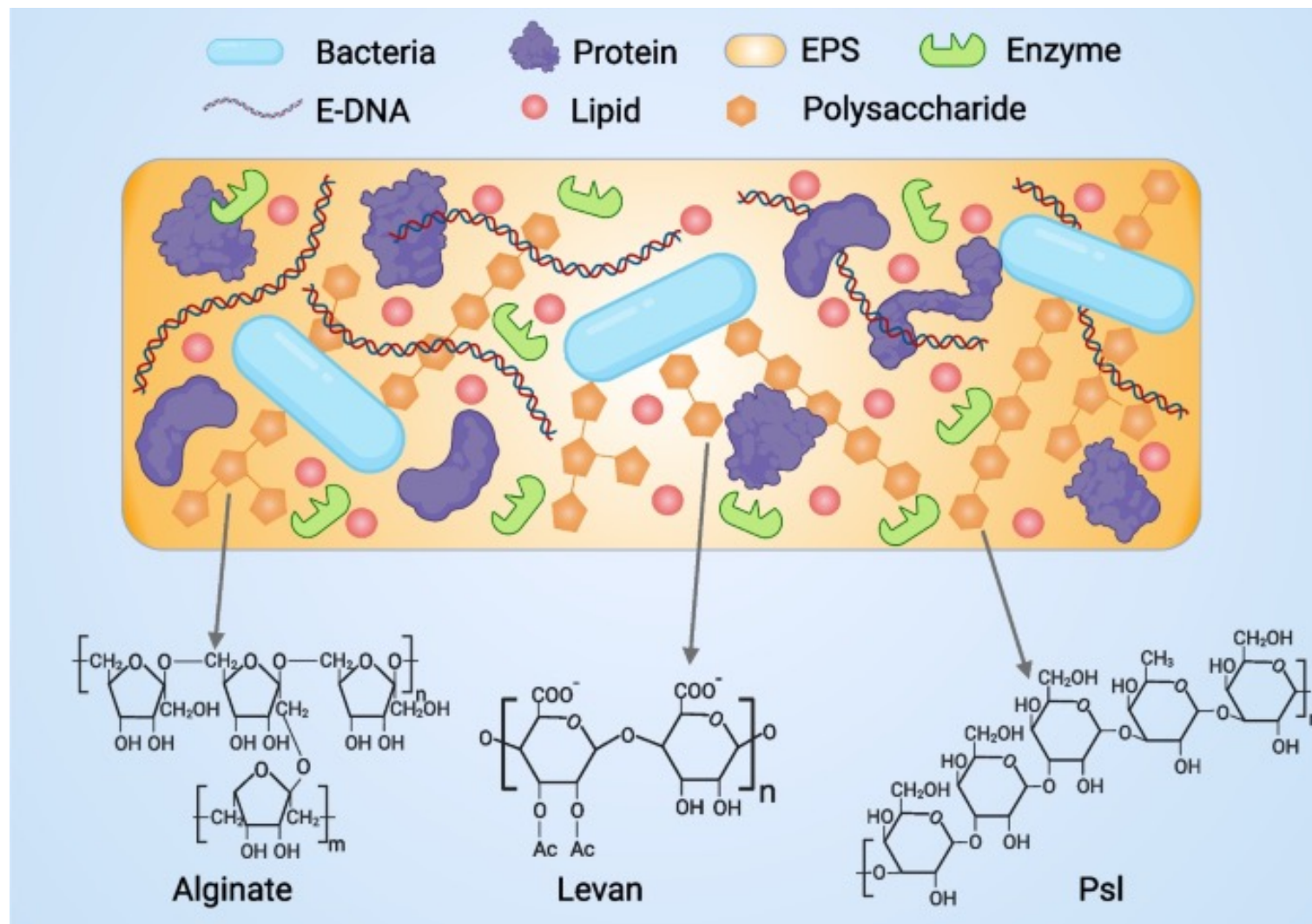
Estas comunidades tridimensionais, monoespecíficas ou **polimicrobianas**, estão imersas numa matriz autoproduzida que permite a troca intercelular de metabolitos, material genético e moléculas de sinalização.

Estes consórcios microbianos oferecem proteção contra predadores e agentes antimicrobianos, e são amplamente estudados devido à sua relevância clínica, à sua natureza ubíqua e aos insights funcionais que proporcionam sobre a ecologia microbiana.

Embora a maioria dos biofilmes naturais sejam polimicrobianos, muito se aprendeu sobre a biologia básica destas comunidades através do estudo de biofilmes monoespecíficos utilizando bactérias modelo.

1. Reversible attachment
2. Irreversible attachment
3. Micro colony
4. Maturation
5. Cellular detachment





Objetivos



- Avaliar quantitativamente a formação de biofilmes por estirpes isoladas de sapal.
 - Comparar formação de biofilmes em culturas individuais e em co-cultura.
 - Diferenciar biomassa total, fração planctónica e componentes da matriz.
 - Avaliar a eficiência relativa de formação de biofilme em co-culturas versus culturas puras.
- 

1. Princípio do método experimental

- **Formação de biofilme:** microrganismos crescem em meios nutritivos líquidos e aderem a superfícies sólidas. O crescimento inicial leva à adesão celular, seguida pela produção de matriz extracelular polimérica (EPS), formando o biofilme.
- **Seleção do crescimento em biofilme:** ao contrário do crescimento planctônico (livre em solução), apenas células que aderem e produzem matriz permanecem após lavagens sucessivas, permitindo discriminar biofilme de células livres.
- **Deteção/quantificação:** uso de corantes específicos (por exemplo, cristal violeta) que se ligam à matriz e células do biofilme + medição da absorbância a comprimento(s) de onda definido(s) permite quantificar biomassa aderida, refletindo a capacidade de formação do biofilme.

O método avalia **potencial de adesão, formação de matriz e resistência a remoção**, permitindo comparar estirpes, condições ambientais ou efeitos de compostos sobre a formação do biofilme.

2. Microrganismos

- Estirpes de bactérias isoladas em ambiente de sapal:
 - Estirpe 24, isolada de solos
 - Estirpe 179, isolada de raízes
 - Estirpe 214, isolada de raízes
- Cada estirpe testada separadamente
- Em co-cultura

3. Protocolo para cada grupo

- Testar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de:

2 estirpes de bactérias e em co-cultura

3.1. Inoculação (24 de março)

1. Transferir 1 mL de solução salina estéril para microtubo.
2. Suspende colónias bacterianas em solução salina.
3. Homogeneizar em vórtex.
4. Ajustar a turbidez para aproximadamente 0,5 McFarland.
5. Adicionar 180 μ L de meio em cada poço da microplaca.
6. Preparar as seguintes condições: **Sa** (em triplicado), **Sb** (em triplicado), em **Co-cultura** (Sa + Sb, volumes iguais de cada suspensão) e solução salina (**controle negativo**)
7. Inocular 20 μ L em cada poço respetivo da microplaca.
8. Incubar a 28 °C.

3.2. Quantificação e avaliação (30 de março)

- **A. Quantificação da Fração Planctónica**

1. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para novos poços.
2. Medir absorbância a 600 nm.

- **B. Quantificação da Biomassa Total Solubilizada (ácido acético)**

1. Adicionar 200 μ L de ácido acético a 33 %, e ressuspender com pipeta.
2. Medir absorbância a 600 nm.

3.2. Quantificação e avaliação (30 de março)

- **C. Quantificação de Polissacáridos/Parede (violeta de cristal)**

1. Adicionar 200 μ L de violeta de cristal e deixar atuar durante 10-15 min.
2. Lavar suavemente 3x com 200 μ L água estéril.
3. Secar ao ar.
4. Adicionar 200 μ L de ácido acético 33% para solubilizar o corante.
5. Medir absorbância a 492 nm.

- **D. Quantificação da Matriz (azul de bromofenol)**

1. Adicionar 20 μ L de azul de bromofenol e deixar atuar durante 10-15 min.
2. Lavar suavemente 3x com 200 μ L de ácido acético a 0,5 %.
3. Secar ao ar.
4. Medir absorbância a 600 nm.

[illegible][illegible]

Síntese final:

- Compreender a formação de biofilmes como estratégia adaptativa de microrganismos.
- Diferenciar crescimento planctónico e sésil e quantificar biomassa aderente.
- Avaliar interações entre estirpes individuais e co-culturas na formação de biofilme.
- Reconhecer a relação entre biofilme e potencial biorremediador de óleos vegetais.
- Interpretar criticamente resultados experimentais e limitações metodológicas.

