

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

1. Fundamentação Teórica

A biorremediação baseia-se na capacidade metabólica de microrganismos para transformar ou mineralizar compostos orgânicos, utilizando-os como fonte de carbono e energia. Os óleos vegetais são constituídos maioritariamente por triglicéridos, cuja degradação depende da produção de enzimas extracelulares, nomeadamente lipases e esterases. A hidrólise enzimática dos triglicéridos liberta ácidos gordos e glicerol, que podem ser absorvidos e metabolizados através da β -oxidação e de vias centrais como o ciclo de Krebs. Em meios mínimos sem fonte adicional de carbono, o crescimento microbiano na presença de óleos vegetais sugere capacidade de utilização metabólica desses compostos.

Ambientes de sapal são ecossistemas dinâmicos, ricos em matéria orgânica e sujeitos a flutuações de salinidade, oxigenação e disponibilidade de nutrientes. Estas condições favorecem comunidades microbianas metabolicamente versáteis, frequentemente com capacidade de degradar compostos lipídicos e outros poluentes orgânicos.

Neste ensaio, a utilização de meio M9 suplementado com diferentes fontes de carbono permite avaliar qualitativamente o potencial de crescimento e utilização de substratos lipídicos por estirpes bacterianas isoladas de sapal. A formação de halos ou zonas de clarificação pode indicar atividade lipolítica, embora a ausência de halo não exclua degradação. Assim, este ensaio constitui um modelo simplificado para avaliar o potencial de biorremediação e atividade lipolítica em condições controladas.

2. Objetivos

- 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

3. PRÉ-AULA – Preparação do meio de cultura (M9 suplementado)

Materiais

- Meio M9 suplementado com ágar (sem fonte de carbono)
- Óleos vegetais: azeite e óleo de girassol
- Glucose
- Tween 80 (emulsificante)

- Placas de Petri estéreis
- Agitador magnético com aquecimento
- Sistema de filtração esterilizante (0,22 μm)

a. Meio agar água 750 mL

- Água desionizada: **750 mL**
- Agar: 17,0 g

Autoclavar e manter líquido.

b. Solução de Sais M9 (Concentrado 5X)

Prepare esta base primeiro. Dissolva em 800 ml de água destilada e complete para 1000 ml:

- Água desionizada: **1 litro**
- Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4): 64 g
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4): 15 g
- Cloreto de sódio (NaCl): 2,5 g
- Cloreto de amônio (NH_4Cl): 5 g

Autoclavar.

c. Solução de Metais traço (1000x) 10 mL

- Água desionizada: 10 mL
- Tricloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 0,05 g
- Cloreto de zinco (ZnCl_2): 0,005 g
- Cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): 0,005 g
- Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 0,005 g
- H_3BO_3 : 0,001g

Esterilização: Filtração (0,22 mm) – **guardar no frigorífico num frasco escuro**

d. Solução de Sulfato de magnésio

10 mL de solução de MgSO_4 (1M) – autoclavar ou filtrar

e. Solução de cloreto de cálcio

10 mL de solução de CaCl_2 (1M) - autoclavar ou filtrar

f.1. Mistura tween80+azeite

10 mL de azeite

0,1 mL de tween80 (concentração final no meio 0,01% v/v)
completar até 100 mL com água estéril

filtrar

f.2. Mistura tween80+óleo vegetal

10 mL de óleo

0,1 mL de tween80 (concentração final 0,01% v/v)
completar até 100 mL com água estéril

filtrar

f.2. Solução de glucose (concentração final de 5 g/L)

5 g de glucose

completar até 100 mL com água estéril

filtrar

g. Montagem de 1 Litro de Meio Final

Deixe os frascos arrefecerem num banho-maria ou na bancada até atingirem cerca de 50°C-55°C. Misture assepticamente:

- Adicione, aos 750 mL de meio ágar já autoclavado e ainda líquido, 200 mL da solução de sais (M9 5x), e os suplementos estéreis:
 - 2 mL de MgSO₄ (1M)
 - 0,1 mL de CaCl₂ (1M)
 - 1 mL de solução metais traço (1000x).
- 50 mL da mistura tween/óleo ou glucose estéril (filtração).
- Agite vigorosamente o meio final para criar uma emulsão do óleo no agar.
- Verter nas placas

Preparar:

- Placas com azeite (A)
- Placas com óleo de girassol (O)
- Placas com glucose a 5 g/L (G – controlo positivo)

4. Aula de 24 de março – Inoculação

Materiais

- Estirpe Sa (ecologia)
- Estirpe Sb (ecologia)
- Solução salina estéril (0,85% p/v)
- Microtubos estéreis
- Micropipetas e pontas estéreis
- Vórtex
- Escala de McFarland
- Placas preparadas pré-aula
 - Placas com azeite (A)
 - Placas com óleo de girassol (O)
 - Placas com glucose a 5 g/L (G)
- Estufa (28 °C)

Procedimento

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 μ L de cada inóculo.
 7. Incubar a 28 °C.
- Cada grupo deverá testar ambas as fontes lipídicas.

5. Aula de 31 de março – Avaliação

Avaliar:

- 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

Estirpe	Óleo vegetal	Diâmetro colónias (mm)	Halo (mm)	Observações
Sa	Azeite			
Sa	Girassol			
Sa	Glucose			
Sb	Azeite			
Sb	Girassol			
Sb	Glucose			
Sa+Sb	Azeite			
Sa+Sb	Girassol			
Sa+Sb	Glucose			

6. Guião de discussão e análise crítica

Os estudantes podem analisar os resultados considerando os seguintes pontos:

A. Interpretação Metabólica

1. O crescimento observado permite inferir utilização do óleo como fonte de carbono?
2. Que etapas metabólicas estão envolvidas na degradação de triglicéridos?
3. Qual o papel de lipases extracelulares?
4. Porque o crescimento em glucose serve de referência metabólica?

B. Análise Experimental

5. Porque é essencial utilizar um meio com glucose?
6. Que limitações experimentais podem estar associadas ao uso de Tween 80?
7. A ausência de halo exclui atividade lipolítica?
8. Que controlos adicionais poderiam reforçar a robustez experimental?

C. Interações Microbianas

9. A co-cultura mostrou vantagem?

10. Pode haver cooperação metabólica?
11. Pode ocorrer cross-feeding?

D. Aplicação e Escala

12. Em que medida este ensaio pode ser considerado modelo de biorremediação?
13. Que análises adicionais permitiriam confirmar degradação efetiva (ex.: GC-FID, quantificação gravimétrica, análise de ácidos gordos)?
14. Que fatores ambientais (oxigénio, salinidade, temperatura) influenciariam este processo em ambiente natural?

7. 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

8. Sugestão de bibliografia

- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, Article ID 941810. (Enquadramento conceptual dos processos de biorremediação de compostos hidrofóbicos).
- Fuhrman, J. A. (2009). Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 459, 193–199. (Relação entre diversidade microbiana e função ecológica).
- Madigan, M. T., et al. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson. (Base teórica consolidada sobre metabolismo microbiano e diversidade funcional).
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 249–252. (Papel da biodisponibilidade e emulsificação na degradação de óleos).