

'Biblioteca' armazena clones que atuam na degradação de poluentes

Acervo é composto de amostras de lodo de sistemas de tratamento de efluentes

ISABEL GARDENAL
bel@unicamp.br

Trabalhar com clones modificados geneticamente de acordo com necessidades específicas para degradação de poluentes será uma das possibilidades que o futuro reserva aos especialistas que atuam em sistemas de tratamento de efluentes. Os primeiros passos nesse sentido já foram dados pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp com a implantação da primeira biblioteca metagenômica de amostras de lodo de sistemas de tratamento de efluentes de refinarias. Os clones obtidos, e que formam o acervo da biblioteca, têm a especial capacidade de degradar compostos poluentes, que constituem grandes problemas para uma estação de tratamento.

A nova biblioteca chegou a 13.200 clones analisados durante uma pesquisa de doutorado desenvolvida pela bióloga Cynthia Canedo da Silva no CPQBA. Para isso, ela contou com a orientação da professora Valéria Maia de Oliveira, do Programa de Pós-Graduação de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia (IB), que coordena atualmente a Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do Centro para isolamento, identificação e preservação de micro-organismos provenientes do meio ambiente e da indústria.

Trata-se de um trabalho inédito no Brasil e que tem o financiamento da Petrobras e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). Envolve tecnologia de ponta altamente eficiente para o mercado. "A ideia será trabalhar geneticamente com mutações destes clones, melhorando a sua performance em diferentes condições: baixo pH, alta ou baixa temperatura, e alta ou baixa salinidade. Cada clone, aliás, representa uma tese a ser desenvolvida", revela a pós-graduanda.

A princípio, Canedo caracterizou a microbiota no lodo, a fim de descobrir quais bactérias estavam ali presentes e o que elas estavam fazendo. Mas sua motivação foi mais longe ainda, passando pela obtenção de clones com alta capacidade de degradação de poluentes, tarefa que será desempenhada em maior profundidade no pós-doutorado, quando a pesquisadora deverá triar todos os clones. "Pretendemos fazer uma caracterização genética e descobrir novas rotas metabólicas ligadas à degradação principalmente de compostos fenólicos, como o fenol", conta.

A triagem permitirá a obtenção de clones, ou consórcios destes, que apresentem alta eficiência de degradação de um ou vários compostos aromáticos de difícil degradação e que possam ser empregados em tratamentos complementares de efluentes de refinarias de petróleo e em processos de biorremediação (utilização de seres vivos ou seus componentes na recuperação de áreas contaminadas). Este projeto, e outros nesta linha, propõem analisar a diversidade de genes de degradação de hidrocarbonetos e compostos aromáticos recalcitrantes nas bibliotecas metagenômicas, contribuindo para o conhecimento sobre



A bióloga Cynthia Canedo da Silva (à esq.), autora da tese, e a professora Valéria Maia de Oliveira, orientadora: 13.200 clones analisados

as vias catalíticas usadas na degradação de petróleo e seus derivados.

Processo

A nova biblioteca foi construída a partir de amostra de 2 gramas de lodo. Foi feita a extração do DNA total da comunidade microbiana, chamado metagenoma, seguida da seleção do DNA de alto peso molecular, de aproximadamente 36 kb. O DNA de alto peso foi colocado em vetores com capacidade para grandes insertos. "Essa biblioteca tem no final uma coleção de células-hospedeiras denominadas *Escherichia coli*, cada qual carregando um pedaço do DNA da comunidade microbiana daquela amostra", explica Canedo.

O acervo fica sediado no CPQBA, onde está acondicionado em microplacas contendo meio de cultivo e glicerol, preservado por ultracongelamento num freezer a -80°C. Todos os clones foram pirosequenciados, ou seja, tiveram a sua sequência de DNA desvendada. Esta etapa foi efetuada na Austrália, onde Canedo viveu seis meses de trabalho produtivo. Ela desenvolveu seu projeto no Victorian AgriBiosciences Centre do Department of Primary Industries (DPI), em Melbourne. É o centro de pesquisa de melhoramento genético localizado na La Trobe University.

A biblioteca se prestará a novas pesquisas de bioprospecção do DNA

metagenômico de toda a comunidade microbiana em questão. "Ela tem insertos de DNA de alto peso", relata Oliveira, cujos fragmentos podem conter operons, com vias biossintéticas inteiras dentro deles, os quais possibilitam fazer um *screening* para atividades diversas, como enzimas de interesse industrial e genes de degradação de compostos poluentes de áreas impactadas, como também para degradação de hidrocarbonetos, produção de antibióticos e outros compostos bioativos.

Além dessa biblioteca, de 13.200 clones, uma outra existente no CPQBA é a de Sedimento Impactado, da Baía da Guanabara, que totaliza seis mil clones e outra ainda derivada de uma comunidade microbiana de reservatórios de petróleo, com 31 mil clones. Com isso, somam ao todo pouco mais de 50 mil clones metagenômicos no momento. "É um grande volume e pretendemos ampliá-lo. Uma aluna já está construindo uma biblioteca de digestor anaeróbio de esgoto sanitário e, em breve, começaremos as bibliotecas metagenômicas de mangue", informa Oliveira.

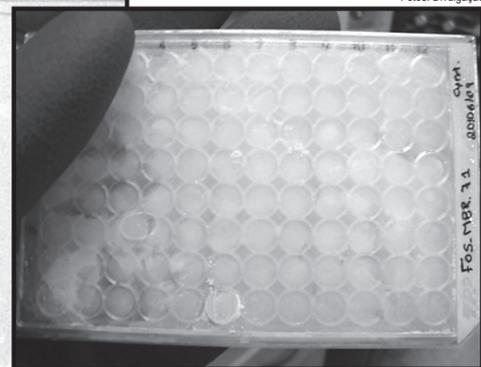
Mas a aplicação maior, avalia Canedo, será mesmo a adição desses clones com alta capacidade de degradação de fenol em sistemas de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo. Este trabalho, adianta, não será feito no próprio reator. A intenção é fazê-lo em um reator separado para

proteção contra escape de organismos geneticamente modificados. "O sistema será bem-controlado com contenção adicional, a fim de tratar os poluentes de difícil degradação presentes no biorreator, os chamados compostos refratários (ou recalcitrantes)", informa Canedo. Esses clones teriam a capacidade de degradá-los. "Se não tratado, quando determinado efluente cai num rio, ele pode ter componentes tóxicos aos peixes, à microbiota e a todos os seres vivos. Então a proposta é fazer um sistema em que o efluente, ao cair no rio, já esteja limpo e, quem sabe, pronto para reúso pela própria indústria."

Segundo Oliveira, as concentrações que os efluentes têm de compostos recalcitrantes não são tão altas, no entanto podem inviabilizar a liberação num corpo d'água, num rio. Ocorre que as indústrias hoje, sobretudo as do setor petrolífero, usam muita água. "Para processar um metro cúbico de óleo, são utilizados até 0,6 m³ de água", exemplifica. Assim sendo, constata a orientadora do trabalho, o ideal é que no processo industrial a água esteja tão limpa a tal ponto que possa ser reutilizada, o que reduziria os custos com a produção e com sistemas "mais refinados" de tratamento. As indústrias de papel e celulose, têxteis, farmacêuticas, petroquímicas, de vernizes e de tintas, que geram grandes quantidades de resíduos líquidos, seriam os setores

Foto: Antoninho Perri

Fotos: Divulgação



No alto, microplaca onde são preservados os clones e, acima, detalhe da biblioteca metagenômica

mais favorecidos neste particular.

Conclusões

Na investigação, Canedo concluiu que o lodo apresentava uma alta diversidade bacteriana, genética e funcional. Em termos de degradação de fenol, por exemplo, verificou-se que mais de 200 clones conseguiram crescer em meio mineral adicionado de fenol como única fonte de carbono. Esses clones, aponta a pós-graduanda, demonstraram potencial de uso e exploração em processos biotecnológicos. "Podem ser aplicados em processo piloto para avaliar a degradação de fenol, através de ensaios cromatográficos."

Notou-se ainda a presença de novos genes relacionados com a degradação desses compostos poluentes – como fenol, alcano, tolueno, bifenil. Alguns são compostos refratários presentes em efluentes provenientes de refinarias de petróleo, sendo de difícil degradação. Na prática, esses compostos estariam sendo tratados antes de serem liberados no corpo receptor.

Conforme Oliveira, o trabalho de sua orientanda é o primeiro no país na linha de metagenômica aplicada. "Está na vanguarda, buscando uma atividade na indústria", define. No exterior, a metagenômica vem rendendo frutos concretos há algum tempo, estudando e explorando a diversidade microbiana por meio de uma metodologia que independe de isolamento e cultivo de micro-organismos a partir da clonagem direta de DNA de amostras ambientais, o metagenoma.

Nos últimos anos, novas abordagens de trabalho, envolvendo metodologias de bioinformática e de biologia molecular, vêm permitindo a prospecção de informações a partir de dados genômicos. Canedo fez isso ao longo de quatro anos, começando em 2006.

Artigos

■ Silva, C.C.; Jesus, E.C.; De Paula, S.O.; Torres, A.P.R.; Sousa, M.P.; Santiago, V.M.J.; Oliveira, V.M. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:447-59, 2010.
■ Silva, C.C.; Viero, A.F.; Dias, A.C.F.; Andreote, F.D.; Jesus, E.C.; De Paula, S.O.; Torres, A.P.R.; Santiago, V.M.J.; Oliveira, V.M. Monitoring the bacterial community dynamics in a petroleum refinery wastewater membrane bioreactor fed with a high phenolic load. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:17-25, 2010.

Publicação

Tese de Doutorado "Prospecção da atividade de degradação de fenol em metagenoma microbiano originado de efluente de refinaria de petróleo"
Autora: Cynthia Canedo da Silva
Orientadora: Valéria Maia de Oliveira
Unidade: Instituto de Biologia (IB)
Financiamento: Fapesp