



Universidade Departamento de Biologia
de Aveiro
2009

**Sónia Cristina Dias
Fernandes**

**Comunidades bacterianas em solos
com capacidade de retenção de
radionuclidos**

**Bacterial communities in soils with
ability to retain radionuclides**



**Sónia Cristina Dias
Fernandes**

**Comunidades bacterianas em solos
com capacidade de retenção de
radionuclidos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Isabel Flausino Paiva, Investigadora Auxiliar da Unidade de Protecção e Segurança Radiológica do Instituto Tecnológico e Nuclear e co-orientação da Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.



Instituto Tecnológico e Nuclear
Unidade de Protecção e Segurança Radiológica

O trabalho efectuado nesta dissertação foi desenvolvido no âmbito do Projecto KADRWaste, PTDC/CTE-GEX/82678/2006, da FCT, a quem se agradece o financiamento.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao Sérgio pelo seu
apoio incondicional.

O Júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Isabel Flausino de Paiva
Investigadora Auxiliar do Instituto Tecnológico e Nuclear

Prof. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Octávia Gabriela da Silva Viegas Nené Monteiro Gil
Investigadora Auxiliar do Instituto Tecnológico e Nuclear

Agradecimentos

A realização deste trabalho não poderia ter sido efectuada sem o apoio de inúmeras pessoas e instituições, que tudo fizeram para que pudesse chegar a bom termo. Assim sendo gostaria de agradecer:

Ao Instituto Tecnológico e Nuclear por me ter recebido, e pelo apoio logístico que permitiu que este trabalho fosse executado.

Ao Doutor Pedro Vaz, ao Engenheiro Romão Trindade e à Doutora Berta Martins, do Instituto Tecnológico e Nuclear, por tudo o que fizeram para que nada faltasse.

À Doutora Isabel Paiva (Instituto Tecnológico e Nuclear), e à Professora Doutora Ângela Cunha (Universidade de Aveiro), orientadora e co-orientadora do trabalho, respectivamente, pela orientação, apoio e amizade, sem os quais este trabalho nunca seria feito.

Ao Doutor Newton Gomes (Universidade de Aveiro) por tudo o que me ensinou, e pelo acompanhamento e ajuda no trabalho.

Ao Mestre Pedro Duarte (Instituto Tecnológico e Nuclear) por me ter cedido as amostras, e alguns dados das mesmas, e pelas questões sempre pertinentes que me ajudaram.

À Ana Luísa Santos e ao Francisco Coelho, alunos de Doutoramento em Microbiologia da Universidade de Aveiro, e aos estudantes de Mestrado em Microbiologia da Universidade de Aveiro Verónica Inês Nogueira, Carla Pereira e Nádía Osório, pela prontidão e disponibilidade em ajudar.

A todos os colegas do Instituto Tecnológico e Nuclear, pela ajuda no laboratório, pelo companheirismo e momentos de boa disposição.

A todos os amigos, aos que estão perto e aos que estão longe, mas que contribuíram para eu me ter tornado na pessoa que sou hoje.

E finalmente, um agradecimento especial à minha família, principalmente aos meus pais e ao meu namorado, Sérgio Amendoeira, por nunca me deixarem desanimar, por todo o apoio sem o qual teria sido mais difícil chegar aqui.

Palavras Chave

Abundância bacteriana, solos, gestão de resíduos radioactivos, Césio, DGGE, repositório

Resumo

A procura de soluções para a gestão dos resíduos radioactivos tem sido alvo de vários estudos em vários países, ao longo de mais de 30 anos. O modelo actual preferencial para a armazenagem definitiva de resíduos radioactivos de alta actividade envolve a utilização de galerias em formações geológicas de profundidade, o que obriga a estudos prévios do comportamento do solo e da flora e fauna existentes nos locais, de modo a poder prever efeitos futuros na segurança das barreiras de protecção do repositório.

Apesar de os repositórios para resíduos radioactivos de baixa e média actividade não necessitarem de obedecer aos mesmos critérios que no caso dos repositórios geológicos, nomeadamente, o terem de ter em conta as altas actividades e a elevada capacidade calorífica associada àquele tipo de resíduos, também eles têm de ser cuidadosamente e profundamente estudados em todas as suas vertentes (geologia, hidrogeologia, actividade sísmica, ocupação humana, comunidades biológicas, etc.), tal como foi demonstrado no passado em relação ao repositório espanhol para resíduos de baixa e média activa, EL Cabril.

O solo é um ambiente rico em termos de diversidade biológica e as bactérias estão entre os grupos mais representativos tendo, como tal, uma elevada influência na definição das propriedades do próprio solo.

Com este trabalho, pretendeu-se caracterizar as comunidades bacterianas que habitam solos cujas características os classificam como tendo a capacidade de retenção de radionuclidos, em particular do césio (^{137}Cs). Amostras de quatro profundidades diferentes foram colhidas em três locais distintos e analisadas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) de modo a estimar o número de bactéria aeróbias totais, anaeróbias totais e sulfato redutoras. As amostras foram ainda analisadas através da técnica molecular independente de cultivo Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), de modo a avaliar a diversidade estrutural das comunidades bacterianas através de perfis de electroforeses que permitem uma comparação espacial ou temporal dessas comunidades.

Os resultados indicam, para todas as amostras estudadas, uma tendência para redução na abundância de bactérias aeróbias e anaeróbias com o aumento da profundidade. Verificou-se ainda que o número de bactérias anaeróbias foi sempre superior ao número de bactérias aeróbias. Em nenhuma das amostras estudadas foi possível quantificar bactérias sulfato redutoras. A análise dos perfis de DGGE só foi possível para um dos locais amostrados e indica que as amostras tendem a agrupar por profundidades, indicando ainda que existem comunidades específicas para cada camada de profundidade.

Keywords

Bacterial abundance, soils, radioactive waste management, Cesium, DGGE, repository

Abstract

The management of radioactive waste has been the target of several studies and solution attempts. The current model for definitive disposal of high activity wastes, studied in several countries over more than 30 years, involves final disposal in deep geological formations, which makes it necessary to study the behavior of the soil and the flora and fauna that inhabit it to be able to predict the future effects on the safety of the repository's protection barriers.

Despite the fact that repositories for disposal of low and intermediate level wastes do not have to observe the same extreme conditions as for the geological repositories, namely the high activities and heat values, they also need to be deeply and carefully studied in all factors involved (geology, hydrogeology, seismic activity, human occupation, biological communities, etc) as shown in the past, for the example of the Spanish repository for low and intermediate level wastes, El Cabril, in Spain.

Soil is a rich environment in terms of biological diversity and bacteria are among the most representative groups. As such, they are a major influence on defining some properties of the soil itself.

This work addresses the characterization of bacterial communities in soils that possess the capacity to retain radionuclides, in particular Cesium (^{137}Cs). Samples from three distinct locations and four different soil depths were collected and analyzed by Most Probable Number (MNP) technique to estimate the number of aerobic, anaerobic and sulphate-reducing bacteria. A culture independent approach (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE) was also used to characterize the structural diversity of bacterial communities through electrophoretic profiles that allow spatial and/or temporal comparison sediments from different sites and depth layers.

The results reveal a tendency for reduction in the abundance of aerobic and anaerobic bacteria with increasing depth for all studied samples. Anaerobic bacteria were more abundant than aerobic groups. However, it was not possible to quantify sulphate-reducing bacteria in any of the studied samples. The DGGE profiles analysis was only possible for one of the sampled locals and indicates that samples tend group by depth. It also indicates that communities are specific to each layer of depth.

Índice

Índice	VIII
Lista de figuras	XI
Lista de tabelas	XII
1. Introdução	1
1.1. O solo	3
1.2. Radionuclidos – o Césio	4
1.3. Interações entre solos e ¹³⁷ Cs	4
1.4. Interações entre microrganismos e radionuclidos	6
1.4.1. Bio-adsorção	8
1.4.2. Bio-acumulação	8
1.4.3. Reações metabólicas de red-ox	9
1.4.4. Bio-mineralização	9
1.4.5. Bio-transformação	9
1.4.6. Produção de compostos quelantes	9
1.4.7. Corrosão nos contentores de resíduos influenciada por microrganismos	10
1.5. Transporte microbiano de radionuclidos através das barreiras de material argiloso	11
1.6. Migração de radionuclidos mediada por microrganismos na geosfera	11
1.7. Métodos moleculares de análise da diversidade microbiana em solos	11
1.7.1. Extracção de DNA (ácido ribonucleico).....	12
1.7.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)	13
1.7.3. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	14
1.7.4. Análise dos dados	15
2. Materiais e Métodos	16
2.1. Amostragem	16
2.2. Quantificação de microrganismos	16
2.3. Extracção de DNA, PCR e DGGE	17
3. Resultados	18
3.1. Teores de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Totais	18
3.2. DGGE	20

4.	Discussão de resultados	23
5.	Conclusões	25
6.	Perspectivas futuras	26
7.	Bibliografia	27
8.	Anexos	30
8.1.	Protocolos	30
8.1.1.	Extracção de microrganismos de amostras de solos	30
8.1.1.1.	Precauções	30
8.1.1.2.	Equipamento e reagentes necessários	30
8.1.1.3.	Procedimento	30
8.1.2.	Teor de bactérias aeróbias totais	30
8.1.2.1.	Precauções	30
8.1.2.2.	Equipamento e reagentes necessários	30
8.1.2.3.	Procedimento	31
8.1.3.	Teor de bactérias anaeróbias totais	31
8.1.3.1.	Precauções	31
8.1.3.2.	Equipamento e reagentes necessários	31
8.1.3.3.	Procedimento	31
8.1.4.	Teor de bactérias Sulfato Redutoras	32
8.1.4.1.	Precauções	32
8.1.4.2.	Equipamento e reagentes necessários	32
8.1.4.3.	Procedimento	32
8.1.5.	Extracção de DNA de amostras de solos	33
8.1.5.1.	Precauções	33
8.1.5.2.	Equipamento e reagentes necessários	33
8.1.5.3.	Componentes do Kit	33
8.1.5.4.	Procedimento	34
8.1.6.	Polymerase Chain Reaction (PCR)	35
8.1.6.1.	Precauções	35
8.1.6.2.	Equipamento e reagentes necessários	35
8.1.6.3.	Procedimento	36
8.1.7.	Denaturing Gradient GelElectrophoresys (DGGE)	37
8.1.7.1.	Precauções	37
8.1.7.2.	Equipamento e reagentes necessários	37

8.1.7.3. Procedimento	39
8.2. Teores de Matéria Orgânica	42
8.3. pH do solo	42
8.4. Percentagem de fracção argilosa	42
8.5. Composição elementar	43

Lista de figuras

Fig. 1: Representação esquemática dos HAS, FES e RES nos minerais filossilicados, resultante do produto de alteração parcial no interior do mineral. Localização dos íons K^+ , NH_4^+ e dos íons hidratados Ca^{2+} , adaptado de De Preter (1990)	5
Fig. 2: Representação esquemática do processo de amplificação de DNA por PCR	13
Fig. 3: Número Mais Provável de bactérias aeróbias totais, anaeróbias totais, para as profundidades 0 a 10 cm, 10 a 20 cm, 20 a 30 cm e 30 a 40 cm, do local MM03	18
Fig. 4: Número Mais Provável de bactérias aeróbias totais, anaeróbias totais, para as profundidades 0 a 10 cm, 10 a 20 cm, 20 a 40 cm e 40 a 60 cm, do local MM11	19
Fig. 5: Número Mais Provável de bactérias aeróbias totais, anaeróbias totais para as profundidades 0 a 10 cm, 10 a 20 cm, 20 a 30 cm e 30 a 40 cm, do local MM12	20
Fig. 6: Fingerprints das comunidades bacterianas do local MM03, obtidas por DGGE. SD-1: Profundidade 0 a 10 cm; SD-2: Profundidade 10 a 20 cm; SD-3: Profundidade 20 a 30 cm; SD-4: Profundidade 30 a 40 cm; ST: Standard bacteriano	21
Fig. 7: Dendrograma construído com os perfis de DGGE do local MM03. As diferenças entre os perfis estão indicadas em percentagem de similaridade. SD-1: Profundidade 0 a 10 cm; SD-2: Profundidade 10 a 20 cm; SD-3: Profundidade 20 a 30 cm; SD-4: Profundidade 30 a 40 cm; ST: Standard bacteriano	22

Lista de tabelas

Tabela 1: Sequência dos primers usados	36
Tabela 2: Reagentes e quantidade a utilizar por amostra, para a primeira reacção do nested <i>PCR</i>	36
Tabela 3: Reagentes e quantidade a utilizar por amostra, para a segunda reacção do <i>nested PCR</i>	36
Tabela 4: Reagentes e respectivas proporções para preparar gel de DGGE com gradiente (60% - 32%)	39
Tabela 5: Reagentes e quantidades a utilizar na solução de coloração.	41
Tabela 6: Reagentes e quantidades a utilizar na solução de desenvolvimento.	41
Tabela 7: Carbono Orgânico Total (%) determinado em amostras dos locais MM03, MM11 e MM12	42
Tabela 8: pH determinado em amostras dos locais MM03, MM11 e MM12	42
Tabela 9: Percentagem de fracção argilosa determinada em amostras dos locais MM03, MM11 e MM12	42
Tabela 10: Composição elementar parcial determinada em amostras dos locais MM03, MM11 e MM12	43

1. Introdução:

Os resíduos radioactivos produzidos em países sem energia nuclear, como é o caso de Portugal, resultam, fundamentalmente, de dois tipos de situações: resíduos resultantes das actividades mineiras de extracção e tratamento de minérios ricos em rádio e urânio no passado e que são geridos *in-situ* através de técnicas adequadas ao tipo de resíduos em questão e/ou das aplicações de matérias radioactivas nas áreas da saúde, indústria, ensino e investigação.

Os resíduos radioactivos produzidos em Portugal, em consequência da aplicação de matérias radioactivas na saúde, indústria, ensino e I&D, são de uma grande heterogeneidade e incluem fontes abertas com radionuclidos que vão desde o ^{131}I , ^{125}I , ^{99}Tc e outros, de períodos de semi-vida curtos e actividades elevadas, até fontes seladas de elevadas actividades e períodos de semi-vida que vão desde os 5,27 anos para o ^{60}Co para fontes da cobaltoterapia e da indústria, 432,7 anos para o ^{241}Am dos detectores de fumo, 1600 anos para ^{226}Ra usado na medicina e os 30,1 anos para o ^{137}Cs usado tanto na indústria como na saúde, para além de muitos outros radionuclidos.

A gestão segura de resíduos radioactivos, no sentido de proteger o Homem, as espécies não humanas e o ambiente, tem vindo a ser objecto de muitos estudos de forma a serem encontradas soluções, nomeadamente nos países que possuem energia nuclear e reprocessamento de combustível nuclear. Nestes países a principal preocupação é a gestão dos resíduos que na classificação da AIEA, se denominam por HLW-LL (resíduos radioactivos de alta actividade, períodos longos, elevada toxicidade e de elevado poder calorífico). Em termos de modelo de repositório, estes países estudam locais e constroem aquilo que é designado por repositório geológico de profundidade (*deep geological repository*), tendo já adquirindo ao longo de décadas, o conhecimento necessário para conseguir prever o comportamento das formações rochosas escolhidas (granito, argila, sal), dos solos e dos seres vivos que nele habitam, não só para melhor avaliarem os múltiplos tipos de barreira de segurança que deverão ser utilizadas na construção, como saber intervir adequadamente em caso de algumas delas falharem.

Contudo, todos os países possuem resíduos similares aos descritos para a situação portuguesa pelo que investigações com alguma similariedade, têm sido levadas a cabo em diferentes zonas geológicas e também elas com preocupação pelo ambiente envolvente, pela segurança das barreiras de protecção e pelo estudo dos factores que as

podem afectar, nomeadamente, a existência de comunidades bacterianas características dos locais. Neste caso destes resíduos específicos, os países estudam locais e constroem aquilo que é designado por repositório de quase-superfície (*near-surface repositoir*”).

As orientações da União Europeia (Decisão da Comissão Europeia 2005/512/Euratom de 14 de Junho de 2005; Decisão do Conselho Europeu 2007/530/Euratom de 17 de Julho de 2007; Directiva do Conselho Europeu 2009/71/Euratom de 25 de Junho de 2009) são no sentido de que todos os Estados-Membros devem procurar e implementar soluções para a questão da gestão segura dos resíduos radioactivos produzidos, de acordo com as características desses resíduos, as condições económicas específicas e os conhecimentos adquiridos à época. Nessas soluções, deverão estar considerados princípios fundamentais da gestão de resíduos radioactivos (IAEA, Agência Internacional de Energia Atómica) nomeadamente a protecção do ambiente e do homem. Deste modo são necessários diversos e aprofundados estudos que permitam prever a durabilidade, robustez e adequabilidade destes repositórios e as situações que poderão pôr em causa a sua integridade. Independentemente da importância da segurança física, nomeadamente, a intrusão humana, as interacções entre o solo, os microrganismos que o habitam e os efeitos na estrutura do repositório, logo, nas interacções com os radionuclidos que, eventualmente já contenha (essencialmente ^{137}Cs , devido ao *fallout*) ou venha a conter, são factores fundamentais a serem estudados.

Neste trabalho pretende-se estudar a diversidade bacteriana de amostras de solos previamente seleccionadas por possuírem uma elevada capacidade de retenção de radionuclidos. São amostras ricas em minerais de argilas que, em alguns casos mostraram possuir, para além das clorites e serpentinites, esmectites. Estas, à semelhança das bentonites, têm elevada afinidade para radionuclidos, nomeadamente, o ^{137}Cs . Desta forma pretende-se construir conhecimento sobre as comunidades existentes nas amostras destes solos, possibilitando estudar as possíveis alterações na comunidade bacteriana resultantes das interacções das mesmas com alguns dos radionuclidos existentes nos resíduos radioactivos produzidos em Portugal, nomeadamente o ^{137}Cs . Obter informações sobre a constituição da comunidade bacteriana autóctone em amostras caracterizadas previamente, do ponto de vista químico e radiológico, é

fundamental para caracterizar aquilo que é habitualmente referido como o ponto zero, e é informação essencial para monitorização futura.

1.1. O solo

O solo é um corpo de material inconsolidado, que recobre a superfície terrestre. Os solos são constituídos por três fases: sólida (matriz), líquida (solução do solo) e gasosa (atmosfera do solo). A matriz é a porção que contém minerais e matéria orgânica. As substâncias minerais quanto ao tamanho podem dividir-se em elementos grosseiros e terra fina, que inclui a areia, o limo e a argila, sendo a textura do solo definida pelas proporções de partículas de diferentes dimensões.

A fracção da argila é a principal responsável pelas propriedades químicas do solo, e é principalmente constituída por minerais argilosos pertencentes aos grupos da caulinite, esmectite, vermiculite, illite ou clorite. Estes minerais têm predominantemente cargas negativas, permanentes ou dependentes do pH. Os minerais de argila diferem quanto às cargas que transportam, superfície específica, capacidade de fixar iões potássio e amónio, e ainda por serem ou não expansíveis. Nesta fracção existem ainda óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e manganésio.

A fracção da matéria orgânica suporta uma grande variedade de seres vivos, desde microrganismos como bactérias e fungos a macrorganismos como nemátodos e anélídeos. Os organismos do solo, e em especial os microrganismos vão proceder à decomposição de resíduos orgânicos, e à síntese de moléculas orgânicas de elevada estabilidade, que constituem o húmus e têm um papel importante na capacidade de retenção de água e nutrientes.

A fracção da solução do solo contém vários elementos em forma de iões livres ou complexos e quelatos formados com ligandos minerais e orgânicos.

A fracção da atmosfera do solo tem teores elevados de vapor de água e de dióxido de carbono, e mais baixos de oxigénio, comparativamente com a atmosfera. Em solos compactados, com baixa porosidade e em solos alagados geram-se condições de anaerobiose que são tolerados por apenas alguns microrganismos.

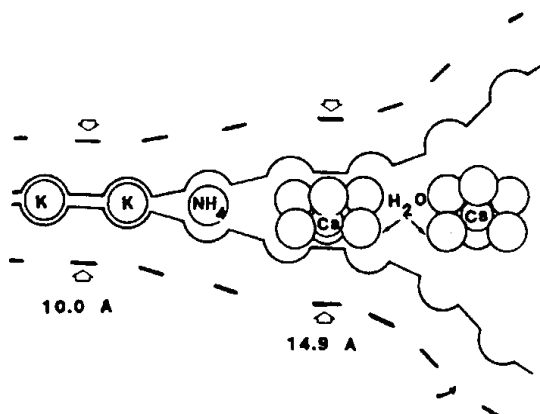
1.2. Radionuclidos – o Césio

O radionuclido Césio (Cs) foi descoberto em 1860, por Kirchhoff e Bunsen (Avery, 1996), numa água mineral da Bavária. O isótopo estável (^{133}Cs) deste metal alcalino despertou pouco interesse, devido ao seu baixo valor económico. No entanto, dos ensaios nucleares dos anos 40 e do acidente de Chernobyl, resultou numa libertação em larga escala de radioisótopos de Cs para o ambiente, em particular do radionuclido ^{137}Cs , cujo período de semi-vida é de 30,1 anos. Embora o Césio tenha uma elevada disponibilidade biológica, semelhante à do potássio, o que favorece a sua absorção pelas plantas e conseqüente incorporação na cadeia alimentar, caracteriza-se igualmente por ter uma elevada solubilidade e mobilidade em sistemas aquosos. De entre os isótopos radioactivos de Cs, o ^{134}Cs e o ^{137}Cs , são os de maior impacto radiológico, tanto do ponto de vista da irradiação interna, em virtude do seu relativo longo período de semi-desintegração (^{137}Cs : $T_{1/2} \approx 30$ anos) e elevada radiotoxicidade (Andrade, 2009) Em resultado dos testes nucleares dos anos 40 e 50 efectuados tanto a nível da superfície terrestre, como subterrâneos e no mar e ainda em consequência do acidente de Chernobyl. Ainda hoje é possível detectar a presença deste radionuclido, por espectrometria gama, em amostras de solos e vegetação, um pouco por todo o planeta sendo, por isso, considerado um dos mais importantes radionuclidos de origem antropogénica encontrados no ambiente.

1.3. Interações entre solos e ^{137}Cs

As interações entre factores bióticos e abióticos e o ambiente têm impacto no comportamento do ^{137}Cs , influenciando a sua mobilidade ou retenção. (Chiu et al, 1999) O ^{137}Cs interage fortemente com alguns solos, devido à sua baixa tendência de hidratar e maior capacidade de polarização do que os iões de potássio (K^+), verificando-se uma reduzida migração vertical. A sua capacidade de se ligar aos solos depende essencialmente do conteúdo relativo de minerais inorgânicos relativamente à matéria orgânica, ligando-se fortemente a minerais de argila, principalmente ilite mesmo que a quantidade destes minerais seja baixa (Avery, 1996; Nikolova et al, 2000; Bellenger & Staunton, 2008) Em solos ricos em argilas há uma forte adsorção de ^{137}Cs , sendo possivelmente irreversível, devido às extremidades desgastadas deste mineral. (Parekh

et al, 2008) Ainda antes do acidente no reactor 4 da Central Nuclear de Chernobyl, já alguns investigadores estudavam o comportamento do radiocésio em vários tipos de matrizes naturais (*Chhabra et al*, 1975), mas o grande incremento foi após essa data, em que foram desenvolvidos imensos estudos, tendo sido determinados os factores fundamentais relativamente às interações minerais de argilas e o radiocésio: a capacidade de troca catiónica (*Cation Exchange Capacity, CEC*), os sítios específicos de adsorção (*Frayed Edge Sites, FES*) e o potencial de intercepção do radiocésio (*Radiocesium Interception Potencial, RIP*) para o ião Potássio (K^+), utilizando-se a espectrometria gama como técnica para a quantificação do radiocésio. Os FES são altamente selectivos para o Cs^+ e para o K^+ , em sistemas naturais, devido a estes catiões apresentarem baixa energia de hidratação. (*De Preter*, 1990; *Madruga*, 1993; *Madruga & Cremers*, 1997) A adsorção do Cs^+ num determinado material geológico depende das concentrações relativas de alguns minerais de argila, como a esmectite/vermiculite e mica/illite que são, respectivamente, os principais contribuintes dos RES (*Regular Exchange Sites*) e dos FES. De acordo com Bolt *et al* (1963) E Wauters *et al* (1996) os



(High Affinity Sites – HAS).

sítios de adsorção dos minerais de argila são de três tipos (Fig.1): i) sítios de troca à superfície (*Regular Exchange Sites – RES*), ii) sítios entre camadas perto dos rebordos das partículas de argila (FES) e iii) sítios altamente específicos situados entre camadas no interior das partículas

Figura 1: Representação esquemática dos HAS, FES e RES nos minerais filossilicados, resultante do produto de alteração parcial no interior do mineral. Localização dos íons K^+ , NH_4^+ e dos íons hidratados Ca^{2+} , adaptado de De Preter (1990)

1.4. Interacções entre microrganismos e radionuclidos

A maior parte dos estudos conhecidos e publicados sobre interacções entre microrganismos e radionuclidos estão ligados à armazenagem definitiva de resíduos radioactivos de elevada actividade, períodos de semi-desintegração longos ou de combustível gasto, ou seja, em repositórios geológicos. Mas, estudos que foram conduzidos, seja para o caso de El Cabril (Espanha) como para L'Aube (França) para repositórios de superfície (resíduos de baixa e média actividade com períodos de semi-desintegração intermédios ou longos) demonstraram também serem a dissolução e o transporte/migração dos radionuclidos os principais mecanismos de dispersão em caso de eventual libertação. A presença de microrganismos pode ter um papel importante no transporte dos radionuclidos, sendo os principais mecanismos a adsorção à parede celular ou acumulação no interior da célula de microrganismos móveis, imobilização dos radionuclidos em biofilmes, produção de agentes complexantes pelo microrganismo que alteram a mobilidade dos radionuclidos, afectando a transformação entre formas solúveis e insolúveis. (Pedersen & Ekendahl, 1990; Gadd, 2000; West et al, 2006)

Estudos laboratoriais demonstraram que o Cs^+ é acumulado nos microrganismos por via de sistemas de transporte activo de K^+ , devido à sua semelhança química. Esta acumulação depende da concentração de catiões monovalentes existente externamente, funcionando como competidores. (Bossemeyer et al, 1989; Avery, 1996; HaiLei et al, 2007) É considerado de forma generalizada que o Cs^+ não é tóxico para os microrganismos, tendo sido reportado crescimento microbiano em ambientes altamente contaminados com ^{137}Cs , como os reservatórios de arrefecimento na central nuclear de Chernobyl não sendo a presença de elevados níveis de radiação garantia de esterilidade no repositório (Avery, 1996; West et al, 2006) Além disso tem sido sugerido que a actividade de microrganismos (*Bacillus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas fluorescens*) é responsável pela forte retenção na camada superior do solo de radiocésio proveniente do acidente de Chernobyl (Avery, 1996).

Os microrganismos interagem com o seu meio envolvente, muitas vezes alterando-o, podendo ser responsáveis pela deterioração das barreiras de protecção dos repositórios de resíduos radioactivos. Já foi demonstrado que os microrganismos podem sobreviver e crescer em condições extremas, como elevados níveis de radiação, condições de pH e temperatura extremas. (*Farkas et al, 2002; Diosí et al, 2003; Pedersen, 2005*)

É importante conhecer a ecologia das propriedades de adsorção dos microrganismos que podem habitar os locais escolhidos para estudo e suas imediações. Assim, é fundamental obter informações sobre a constituição da comunidade bacteriana autóctone, para se poder tentar prever quais as interacções entre esta comunidade e os radionuclidos em estudo, devendo ter-se em conta que o tamanho da população não é indicador da sua actividade. Comunidades com um grande número de microrganismos podem não ser activas, enquanto que comunidades com baixo número de microrganismos podem ter uma elevada actividade. É ainda de ter em conta que qualquer alteração ao meio ambiente pode alterar a estrutura da comunidade e/ou a sua actividade. (*Pedersen & Ekendahl, 1990; Kosareva, et al, 2007*)

Uma vez que os microrganismos possuem a capacidade de utilizar uma variada gama de fontes de energia, como a luz, matéria orgânica e inorgânica, estes microrganismos têm a capacidade de habitar diversos ecossistemas, incluindo camadas profundas do solo, o que já foi demonstrado num estudo efectuado em *Yucca Mountain*, Nevada, EUA (*Fredrickson & Balkwill, 2006*). Neste local, que tem vindo a ser estudado nos últimos 25 anos, está a ser considerado para albergar futuramente um repositório definitivo para resíduos radioactivos de média e alta actividade, localizado 300m abaixo da superfície e 300m acima do lençol freático, observou-se que o factor limitante para o crescimento das populações microbianas era a quantidade de água, mesmo quando os nutrientes se encontravam em quantidades limitadas, o que poderá dever-se ao facto de a água influenciar a difusão dos nutrientes.

Os microrganismos também podem ter influência na estabilidade do repositório, em especial as bactérias sulfato redutoras. Estas bactérias são um grupo heterogéneo de bactérias anaeróbias que reduzem sulfato, sulfito, tiosulfato e enxofre a sulfeto. Os efeitos do sulfeto produzido por estas bactérias são bastante conhecidos em indústrias

do petróleo, gás e naval, onde produzem enormes prejuízos devido à corrosão. (*Beech & Gaylarde, 1999*)

Alguns estudos do Äspö Hard Rock Laboratório, na Suécia, demonstraram que bactérias sulfato redutoras podem provocar corrosão, ameaçando a integridade do repositório definitivo para resíduos da alta actividade. (*Fredrickson & Balkwill, 2006*) Contudo, alguns estudos também demonstraram que durante a compactação do material das barreiras de segurança as populações destes microrganismos decrescem consideravelmente, sugerindo que a actividade microbiana não seria suficiente para causar corrosão no repositório.

A acção microbiana pode alterar significativamente a mobilidade de radionuclidos no ambiente. Esta acção pode ser mobilizadora ou imobilizadora dependendo do tipo de processo e do estado dos microrganismos, se estão sob a forma planctónica ou em biofilme. (*Gascoyne & Sargent, 1998; Pedersen, 2005*) Estes processos são: bio-adsorção, bio-acumulação, reacções metabólicas de Red-Ox, bio-mineralização, bio-transformação e produção de compostos quelantes.

1.4.1. Bio-adsorção

Bio-adsorção é a adsorção e acumulação de elementos à superfície das células microbianas. A ligação de metais à superfície celular é feita através de grupos carboxílicos, aminas, hidroxilos, fosfatos e sulfídricos. A bio-adsorção a microrganismos livres vai promover a mobilização de radionuclidos, enquanto a bio-adsorção a microrganismos incluídos num biofilme vai promover a sua imobilização. (*Pedersen, 2005*)

1.4.2. Bio-acumulação

Os microrganismos possuem mecanismos de transporte activo de metais e outros elementos para dentro da célula. Estes mecanismos relacionam-se com o tamanho e carga do elemento em causa. A similaridade entre o Cs^+ e K^+ faz com que ambos sejam transportados para dentro da célula indiferenciadamente. Assim como para o processo

de bio-adsorção, a bio-acumulação por microrganismos livres promove a mobilização, e a bio-acumulação em biofilmes promove a imobilização. (Pedersen, 2005)

1.4.3. Reacções metabólicas de Red-ox

O metabolismo energético dos microrganismos necessita de um dador de electrões reduzido e um aceitador de electrões oxidado. O dador de electrões pode ser um composto orgânico ou inorgânico, sendo o aceitador de electrões por norma um composto inorgânico. Estas reacções de oxi-redução servem de fonte de energia para microrganismos, sendo o oxigénio o aceitador de electrões preferencial para a maior parte das bactérias. Esta redução do oxigénio em ambientes profundos aumenta a actividade dos microrganismos. Este processo aumenta a imobilização dos radionuclidos. (Pedersen, 2005)

1.4.4. Bio-mineralização

A ligação de radionuclidos a fosfatos, sulfuretos ou carbonatos, promovida por microrganismos, pode levar à sua precipitação, levando à sua imobilização. (Pedersen, 2005)

1.4.5. Bio-transformação

Os microrganismos podem catalisar a transformação de alguns radionuclidos em formas menos solúveis, promovendo a sua imobilização. No entanto, a bio-transformação de radionuclidos pode não ser significativa, não tendo sido ainda demonstrado em estudos *in situ*. (Pedersen, 2005)

1.4.6. Produção de compostos quelantes

Os microrganismos necessitam de metais para o seu metabolismo, estando estes normalmente disponíveis em pequenas quantidades, e pouco disponíveis devido à sua baixa solubilidade. Assim, os microrganismos produzem vários tipos de compostos quelantes de modo a aumentar a disponibilidade destes metais. Estes ligandos geralmente não são muito específicos, e alguns mobilizam também alguns metais-pesados e radionuclidos. Neste processo de captura dos complexos metal-ligando os microrganismos separam os metais essenciais dos tóxicos, expelindo estes últimos para

o ambiente, favorecendo a sua mobilização. Os efeitos deste processo na mobilização de radionuclidos ainda não são conhecidos, devendo ser um aspecto a ter em conta em estudos futuros. (Pedersen, 2005)

1.4.7. Corrosão nos contentores de resíduos influenciada por microrganismos

A eventual corrosão, a longo prazo, dos contentores de resíduos, influenciada por microrganismos, ocorre como efeito directo dos microrganismos na superfície de metal, ou como efeito indirecto de metabólitos microbianos e pode estender-se para além dos limites do repositório (*far-field*).

Foram efectuados vários estudos no AECL's Undergroud Research Laboratory, Canadá (Gascoyne & Sargent, 1998) para determinar se nas condições reais do meio, a actividade microbiana seria possível de ser detectada na superfície dos contentores (*near-field*) ou só a alguma distância no material de compactação (*near-field e/ou far-field*). Estes estudos sugerem que devido aos efeitos da radiação, temperatura e dessecação não haverá actividade bacteriana na superfície dos ou será muito reduzida nas imediações dos mesmos. No entanto esta actividade poderá ser reactivada se o repositório for inundado e a água ficar em contacto com a superfície dos contentores. A porosidade reduzida do material das barreiras de segurança (cerca de 50nm) também é um factor que dificulta o crescimento microbiano.

Estes estudos permitiram concluir que não é provável que a corrosão dos contentores influenciada por microrganismos ocorra durante algum tempo após a disposição dos resíduos devido à formação de uma zona abiótica resultante da dessecação e radiação. Sendo sugerida uma taxa de corrosão, resultante da actividade de bactérias sulfato redutoras, de cerca de 10^{-3} $\mu\text{m}/\text{ano}$. A esta taxa corrosão nos contentores seriam necessários 10^6 anos para se verificar uma penetração de 1mm. (Gascoyne & Sargent, 1998)

1.5. Transporte microbiano de radionuclidos através das barreiras de material argiloso

O transporte microbiano através do material de compactação é improvável, uma vez que alguns estudos mostraram que as bactérias não têm a capacidade de se movimentar num ambiente tão compacto. A maneira mais provável de os radionuclidos chegarem à geosfera seria através de difusão, apesar de o transporte numa fase mais tardia, pode ser possível devido ao aumento da porosidade.

Vários estudos demonstraram que um elevado conteúdo de argilas nos solos ou sedimentos parece limitar o crescimento bacteriano, devido à reduzida porosidade que reduz o transporte de nutrientes e de produtos de excreção. Outro factor limitante é a baixa actividade da água (a_w) que se verifica nas argilas. Já foi demonstrado que o transporte microbiano em a_w abaixo de 0,996 é pouco provável, e estima-se que o transporte microbiano na zona tampão será de cerca de a_w 0,89. (*Gascoyne & Sargent, 1998*)

1.6. Migração de radionuclidos mediada por microrganismos na geosfera

Uma vez que cheguem à geosfera, o transporte de radionuclidos é afectado pelas características de adsorção dos materiais geológicos, colóides e microrganismos. É provável que as superfícies de rochas fracturadas no solo tenham biofilmes, que poderão ter um papel importante na migração dos radionuclidos para a geosfera.

1.7. Métodos moleculares de análise da diversidade microbiana em solos

Muitos estudos têm sido feitos para se compreender a diversidade e a estrutura das comunidades bacterianas que habitam o solo. Os primeiros estudos foram feitos com

base em metodologias baseadas em culturas de microrganismos, permitindo detectar apenas uma pequena porção da comunidade que é cultivável. A comparação entre contagens de microrganismos totais e cultivados em amostras de diferentes habitats mostrou uma enorme discrepância, sendo actualmente reconhecido que apenas 1% dos microrganismos existentes tenham sido cultivados e caracterizados. (*Muyzer & Smalla, 1998*)

De modo a ultrapassar este obstáculo, o uso de técnicas independentes do cultivo permitiram detectar microrganismos não cultiváveis, assim como obter informação de forma rápida e eficiente acerca da estrutura da comunidade. (*Muyzer & Smalla, 1998; Fredrickson & Balkwill, 2006*) A técnica PCR/DGGE (*Polymerase Chain Reaction/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) tem sido umas das mais utilizadas no estudo de comunidades ambientais.

No protocolo PCR/DGGE existem seis passos principais: amostragem, extracção de ácidos nucleicos, amplificação do gene de interesse por PCR, separação dos produtos de PCR por DGGE, visualização dos perfis e análise dos dados. (*Nakatsu, 2007*)

1.7.1. Extracção de DNA (ácido desoxirribonucleico)

A extracção de DNA (ácido desoxirribonucleico) directamente do solo permite a análise da comunidade bacteriana ultrapassando as limitações decorrentes do cultivo (*Nakatsu, 2007*), no entanto, a complexidade deste tipo de amostras e a eficiência de extracção diferente para diferentes grupos bacterianos representados impõem alguma selectividade a esta extracção.

A quantidade de amostra necessária depende da biomassa microbiana presente, contudo, a amplificação de DNA por PCR diminui a necessidade de grandes quantidades de amostra. A utilização de Kits de extracção de DNA também permite uma suficiente recuperação de DNA utilizando pequenas quantidades de amostra de solo. (*Nakatsu, 2007*)

A extracção de DNA de amostras de solos consiste na suspensão de pequenas quantidades de amostra numa solução que contém detergentes que enfraquecem as

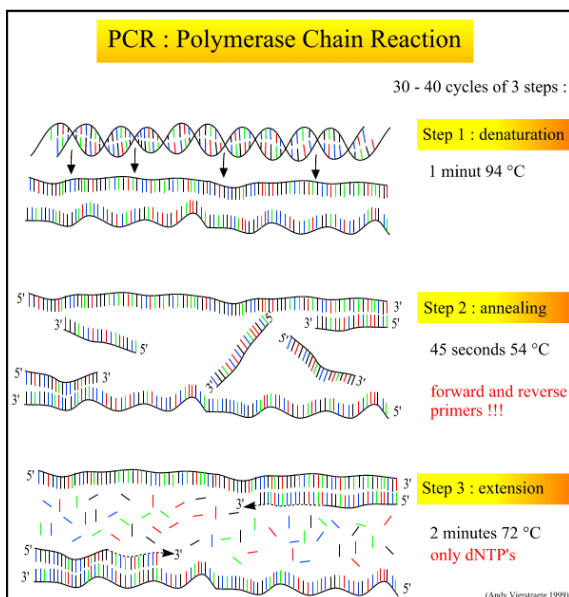
paredes celulares dos microrganismos, e pérolas de vidro que rompem as células, libertando o conteúdo celular. A posterior purificação do DNA extraído é necessária, recorrendo-se a centrifugação, adição de soluções, e filtração.

1.7.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Após a extracção do DNA total das amostras de solo é necessário amplificar o DNA de interesse por Polymerase Chain Reaction (PCR). A Polymerase Chain Reaction é uma técnica que permite o enriquecimento selectivo de uma sequência de DNA específica.

A amplificação por PCR necessita de um par de oligonucleótidos (*primers*) que ligando-se a uma das extremidades do segmento a amplificar por complementaridade de bases azotadas, vão permitir que a enzima *Polymerase* sintetiza a cópia da cadeia de DNA, duplicando a quantidade de DNA. Esta reacção repete-se em ciclos sucessivos, duplicando exponencialmente a quantidade de DNA, cerca de 2^n , sendo n o número de ciclos. A enzima usada é isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, sendo denominada de *Taq Polymerase*. Esta enzima foi escolhida para esta técnica devido à sua capacidade de resistir ao processo de desnaturação das cadeias de DNA que se dá a temperaturas elevadas. (Saiki et al, 1988)

O DNA que codifica RNA ribossomal (rDNA) da sub-unidade pequena (16S) é



normalmente usado para estudos moleculares, devido à sua sequência conter regiões variáveis específicas para determinado género ou espécie, e regiões conservadas partilhadas por quase todas as espécies, úteis para a ligação de *primers*. Um par de *primers* é capaz de amplificar a quase totalidade do 16S rDNA de muitos géneros de bactérias. (Wilson et al, 1990; Weisburg et al, 1991; Harris & Hartley, 2003; Gurtner et al, 2003)

Fig. 2: Representação esquemática do processo de amplificação de DNA por PCR.

De modo a melhorar a amplificação de sequências de 16S rDNA pode ser usada a técnica de *nested* PCR. Nesta técnica são executadas duas reacções de PCR com dois pares de *primers* diferentes. (Boon et al, 2002; Heur et al, 1997) O primeiro par de *primers* amplifica fragmentos de modo similar ao *standard* PCR, o segundo par de *primers* vai amplificar uma região interna em relação ao primeiro par de *primers*. Esta técnica tem a vantagem que em amostras em que há uma mistura complexa de DNA, se houver uma amplificação de um fragmento indesejado na primeira reacção, a probabilidade de voltar a ser amplificado na segunda reacção é muito baixa.

1.7.3. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Ao contrário dos métodos comuns de electroforese, o DGGE separa os fragmentos de DNA pela sua composição e não apenas pelo tamanho. (Nakatsu, 2007) Fragmentos com o mesmo tamanho mas sequências diferentes são separados. A separação é baseada na diminuição da mobilidade das moléculas de DNA parcialmente desnaturadas (com as ligações quebradas entre as bases azotadas das cadeias complementares de DNA), em géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturantes (ureia e formamida). A ligação entre as duas cadeias complementares de DNA é feita por ligações de hidrogénio entre as bases azotadas. Estas ligações podem ser entre Guanina (G) e Citosina (C), com três ligações, ou entre Adenina (A) e Timina (T), com duas ligações. Quando a molécula de DNA atinge a concentração de desnaturante que permite a separação parcial das duas cadeias, a molécula passa da forma helicoidal para a forma linear e a migração pára. A variação da sequência dos nucleótidos na molécula altera a concentração à qual a migração vai parar. (Muyzer & Smalla, 1998) Quanto maior for a quantidade de G+C na molécula maior a concentração de desnaturante necessária para parar a migração.

A detecção de diferentes sequências é cerca de 100% quando se liga à extremidade 5' de um dos *primers* de PCR uma sequência rica em GC (*GC-clamp*). Esta sequência vai ser amplificada juntamente com o DNA e quando é efectuada a separação por DGGE impede a completa separação das duas cadeias de DNA. (Muyzer & Smalla, 1998)

Fingerprints obtidos com este método (DGGE) permitem uma comparação espacial e temporal das comunidades microbianas do solo, dentro do mesmo local ou entre locais diferentes, ou ainda entre tratamentos. (Nakatsu, 2007)

1.7.4. Análise dos dados

Após serem corados, os géis são fotografados ou passados num scanner, e o padrão de bandas é analisado usando software específico. (Martínez-Iñigo, 2009)

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem

A amostragem foi efectuada durante os dias 12 e 13 de Fevereiro de 2009, em três locais previamente determinados, codificados para este trabalho como MM03, MM11 e M12 e devidamente georreferenciados.

Em cada local foram amostradas quatro profundidades: de 0 a 10 cm, 10 a 20 cm, 20 a 30 cm e 30 a 40 cm para os locais MM03 e MM12, e 0 a 10 cm, 10 a 20 cm, 20 a 40 cm e 40 a 60 cm para o local MM11. De cada profundidade amostrada foram colhidas três réplicas.

Para se efectuar a amostragem foi escavada uma parede vertical, foram marcadas as profundidades e colhidas as amostras para frascos de 100ml estéreis, utilizando espátulas estéreis. Todas as amostras foram guardadas a 4°C até serem analisadas.

A composição mineralógica e química dos locais era já conhecida de estudos prévios.

2.2. Quantificação de microrganismos

Os microrganismos foram quantificados usando a técnica do Número Mais Provável (NMP) (*Papen & Berg, 1998*), tendo sido usados os meios de cultura CASO Broth (*Soybean Casein digest broth, Casein-peptone soymeal-peptone broth*) (*Sigma-aldrich*) para bactérias aeróbias totais, *Thioglycollate Broth with Resazurine* (*Sigma Aldrich*) para bactérias anaeróbias totais e *Sulfate API Agar* (*Sigma-aldrich*) para bactérias sulfato redutoras.

Foi suspensa 1 g de cada uma das três réplicas de amostras de solos em 10 ml de água destilada estéril. A suspensão foi agitada no vortex durante 2 minutos, deixando-se depositar as partículas durante cerca de 1 hora. Foram efectuadas diluições decimais sucessivas, que foram inoculadas nos tubos com meios de cultura, e incubados a 32°C durante 24 horas, 48 horas e uma semana, respectivamente para as bactérias aeróbias totais, anaeróbias totais e bactérias sulfato redutoras. Após o período de incubação os resultados positivos foram registados e comparados com tabelas de probabilidades de modo a determinar o NMP para cada grupo de microrganismos.

2.3. Extracção de DNA, PCR e DGGE

Foi extraído o DNA total de três réplicas de cada uma das amostras, usado o Kit *UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, Laboratoires)*.

Foi executado um *nested PCR* (Muyzer et al. 1993), utilizando na primeira reacção os primers 27F (5'-AGAGTTTGAT...GCTCAG-3') e 1494R (5'-CTACGGRTAC...TACGAC -3'), e na segunda reacção os primers 968GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGG-3') e 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGA-3'). As reacções foram realizadas num termociclador *Multigene Thermal Cycler TC900-G*, dando-se a primeira reacção a 94°C durante 5 minutos, ao que se seguiu um ciclo a 94°C durante 45 segundos, 56°C durante 45 segundos e 1 minuto e meio a 72°C, que se repetiu por 30 vezes. Seguiu-se 10 minutos a 72°C, e finalizou-se a 15°C até se retirar amostras do termociclador. A segunda reacção deu-se a 94°C durante 4 minutos, ao que se seguiu um ciclo a 95°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto e 1 minuto e meio a 72°C, que se repetiu por 34 vezes. Seguiu-se um período de 7 minutos a 72°C, e finalizando a 15°C até se retirar amostras do termociclador.

Foram utilizados *Taq polymerase*, nucleótidos e *buffer* adquiridos à *MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania)*.

O DGGE dos produtos amplificados foi executado num *DCodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA)*. As amostras foram carregadas em géis de poliacrilamida com um gradiente desnaturante de 32% a 60% (ureia e formamida), de modo a separar os fragmentos 16S rDNA. A electroforese foi executada a 60°C, a 80V durante 16 horas, sendo os géis posteriormente corados com uma solução de Nitrato de Prata. As imagens dos géis foram adquiridas usando um *Molecular Image FX apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA)*. Os perfis de comunidades bacterianas foram analisados utilizando o programa de software *Gelcompar 4.0 (Applied Maths)*. O Índice de Correlação de Pearson foi calculado para cada par de perfis e construído um dendrograma, e foi efectuada uma análise de clusters pelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*).

3. Resultados

3.1. Teores de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Totais

A variação do teor de bactérias aeróbias totais e anaeróbias totais com a profundidade, nos três locais de amostragem é apresentada nas figuras 3, 4 e 5.

Os teores de bactérias aeróbias totais registados variam entre 23 e 2440 por g de amostra de solo, e correspondem aos valores mais baixos à maior profundidade (30 a 40 cm), e os mais elevados às camadas de 0–10 cm ou 10-20 cm.

Os teores de bactérias anaeróbias totais registados variam entre 43 e 4600 por g de amostra de solo, e correspondem aos valores mais baixos nas camadas 20-30 cm e 30-40 cm, e os mais elevados à camada 0-10 cm.

No local MM03 (figura 3) verifica-se uma tendência de decréscimo do número de bactérias aeróbias totais e anaeróbias totais com o aumento da profundidade. O número de bactérias anaeróbias totais é superior ao número de bactérias aeróbias totais nas profundidades 0 a 10 cm e 10 a 20 cm, sendo ligeiramente inferior para as profundidades 20 a 30 e 30 a 40 cm.

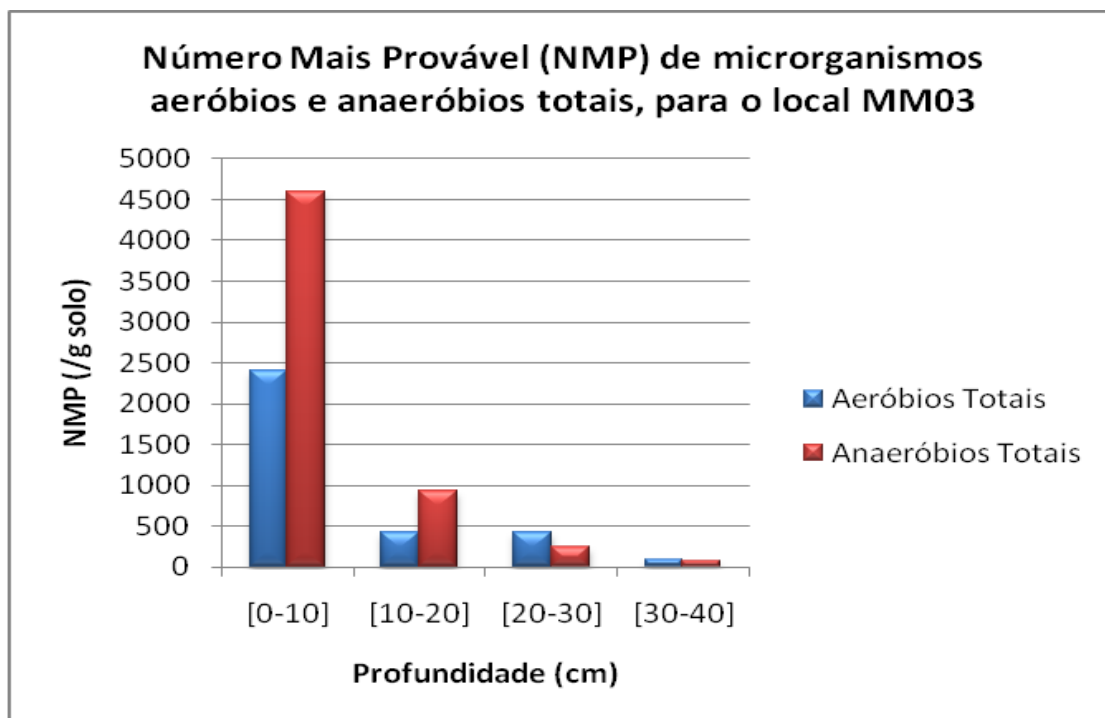


Fig. 3: Número Mais Provável de bactérias aeróbias totais, anaeróbias totais para as profundidades 0 a 10 cm, 10 a 20 cm, 20 a 30 cm e 30 a 40 cm, do local MM03

No local MM11 (figura 4) verifica-se decréscimo do número de bactérias anaeróbias totais com o aumento da profundidade. Este padrão é também registado no caso das bactérias aeróbias totais, sendo interrompido por um ligeiro aumento na profundidade 10 a 20 cm, relativamente ao nível mais superficial. Verifica-se ainda que o número de bactérias anaeróbias totais é superior ao número bactérias aeróbias totais, excepto para a profundidade 40 a 60 cm, em que os teores são idênticos.

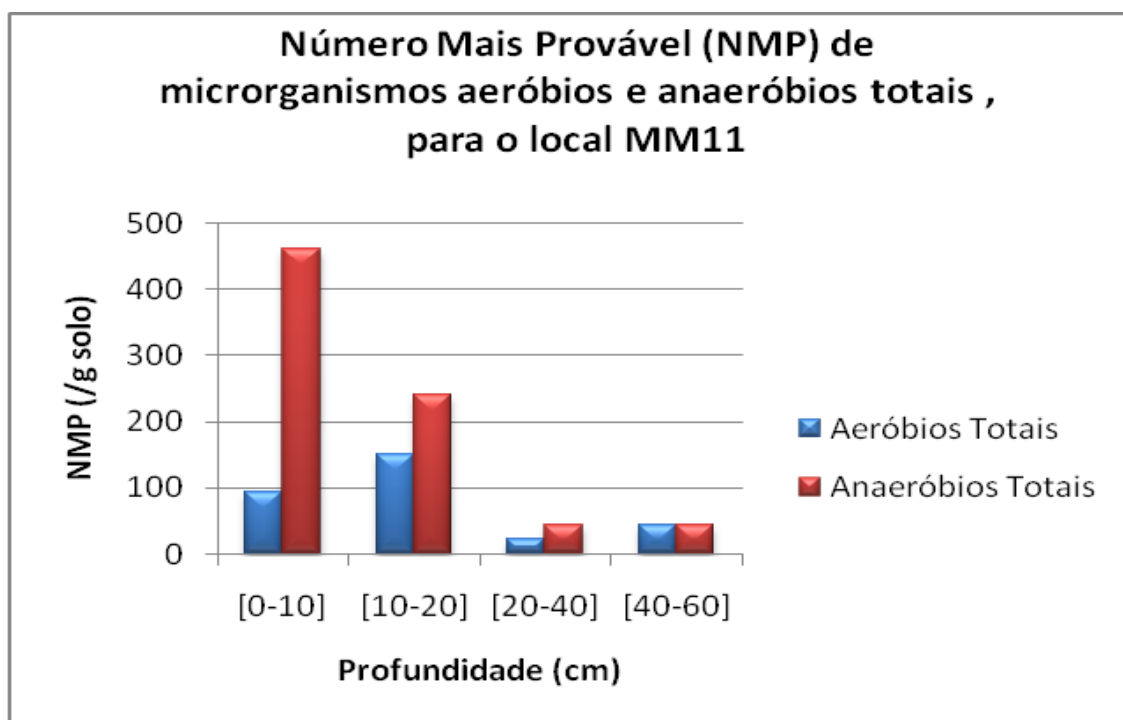


Fig. 4: Número Mais Provável de bactérias aeróbias totais, anaeróbias totais para as profundidades 0 a 10 cm, 10 a 20 cm, 20 a 40 cm e 40 a 60 cm, do local MM11

No local MM12 (figura 5) verifica-se também decréscimo do número de bactérias anaeróbias totais com o aumento da profundidade. Nas amostras deste local, o teor de bactérias aeróbias totais foi muito baixo e constante nas várias profundidades. Verifica-se ainda que o número de bactérias anaeróbias totais é superior ao número de bactérias aeróbias totais em todas as profundidades.

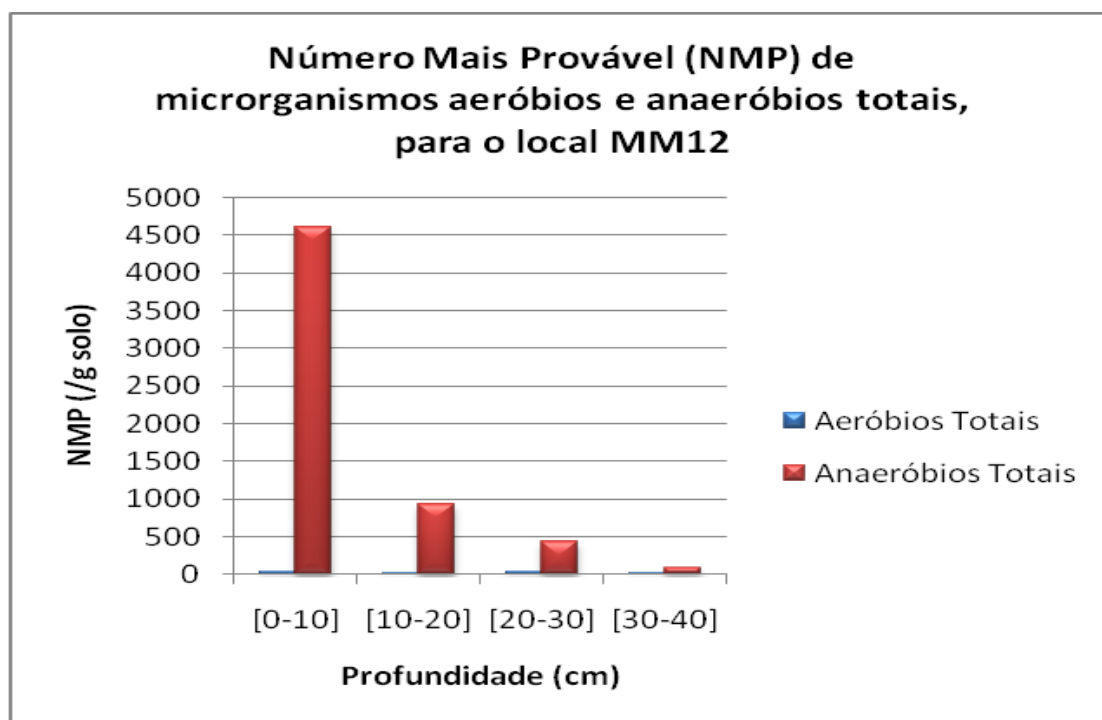


Fig. 5: Número Mais Provável de bactérias aeróbias totais, anaeróbias totais para as profundidades 0 a 10 cm, 10 a 20 cm, 20 a 30 cm e 30 a 40 cm, do local MM12

3.2. DGGE

Após separação dos produtos de amplificação por DGGE, foram obtidos *fingerprints* de 16S rDNA para as diferentes amostras, mas devido a problemas com a qualidade dos géis, apenas puderam ser analisados os perfis correspondentes ao local MM03.

A análise dos perfis de DGGE (figura 6) e do dendrograma (figura 7) para o local MM03 indica que as sub-amostras tendem a agrupar por profundidades, indicando ainda que existem comunidades específicas para cada camada de profundidade. Verifica-se também uma maior variabilidade entre réplicas nas profundidades 0 a 10 cm e 30 a 40 cm.

A análise do dendrograma (figura 7) mostra a existência de dois *clusters* principais, um constituído essencialmente por amostras das profundidades 0 a 10 cm e 30 a 40 cm, e outro constituído essencialmente por amostras das profundidades 10 a 20 cm e 20 a 30 cm. No primeiro *cluster* verifica-se uma similaridade de cerca de 83% entre as amostras SD-1b e SD-1c (ambas pertencentes à profundidade 0 a 10 cm), e uma similaridade também de cerca de 83% entre as amostras SD-4b e SD-4c (ambas

pertencentes à profundidade 30 a 40 cm). Estes dois sub-grupos apresentam uma similaridade entre si de cerca de 60 %, tendo a amostra SD-1a (profundidade 0 a 10 cm) uma similaridade de cerca de 45% com este grupo. No segundo *cluster* verifica-se uma similaridade de cerca de 76% entre as amostras SD-2b e SD-2c (ambas pertencentes à profundidade 10 a 20 cm) e uma similaridade de cerca de 69% deste sub-grupo com a amostra SD-2a (profundidade 10 a 20 cm). Verifica-se também uma similaridade de cerca de 79% entre as amostras SD-3b e SD-3c (ambas pertencentes à profundidade 20 a 30 cm), e uma similaridade de cerca de 72% deste sub-grupo com a amostra SD-4a (profundidade 30 a 40 cm) e de cerca de 70 % com a amostra SD-3a (profundidade 20 a 30 cm). Os dois sub-grupos apresentam uma similaridade entre si de cerca de 55%. Entre os dois *clusters* principais verifica-se uma similaridade de cerca de 40 %.

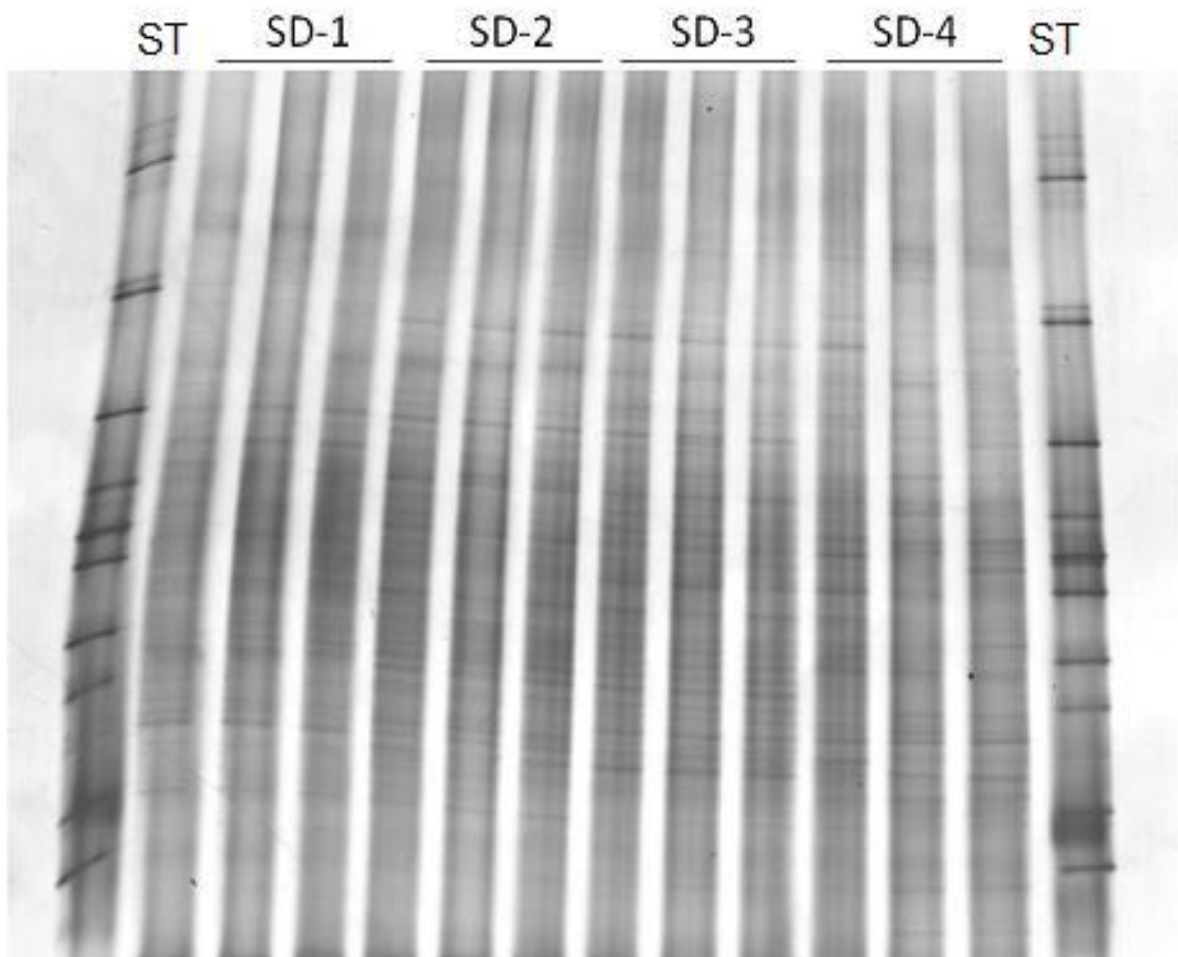


Fig. 6: *Fingerprints* das comunidades bacterianas do local MM03, obtidas por DGGE. SD-1: Profundidade 0 a 10 cm; SD-2: Profundidade 10 a 20 cm; SD-3: Profundidade 20 a 30 cm; SD-4: Profundidade 30 a 40 cm; ST: *Standard* bacteriano.

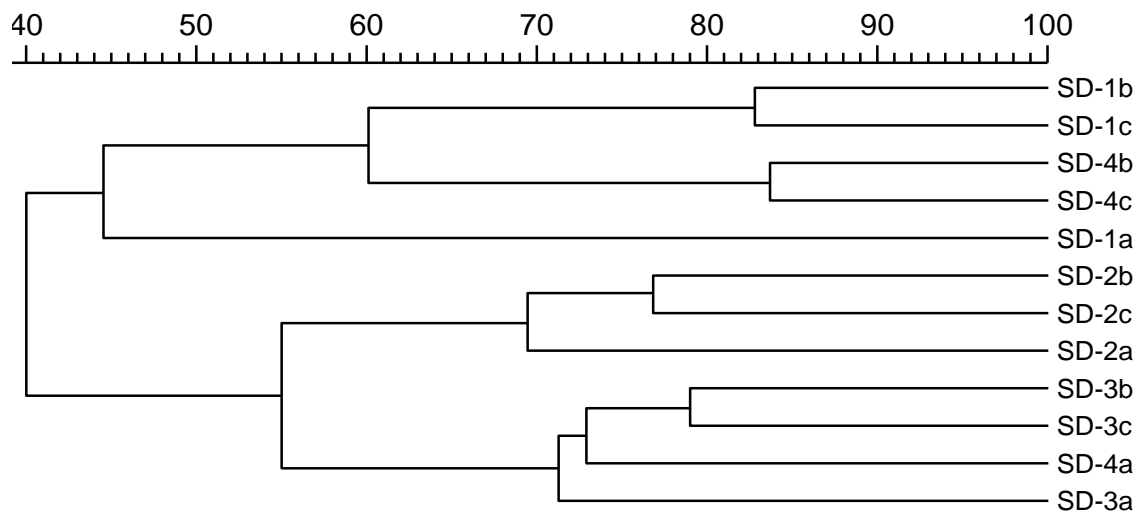


Fig. 7: Dendrograma construído com os perfis de DGGE do local MM03. As diferenças entre os perfis estão indicadas em percentagem de similaridade. SD-1: Profundidade 0 a 10 cm; SD-2: Profundidade 10 a 20 cm; SD-3: Profundidade 20 a 30 cm; SD-4: Profundidade 30 a 40 cm.

3. Discussão de resultados

Para todas amostras estudadas, o número de bactérias anaeróbias totais foi superior ao número de bactérias aeróbias totais. Era de esperar que à superfície o número de bactérias aeróbias fosse mais elevado do que o número das bactérias anaeróbias, e o inverso com o aumento da profundidade. Tal não se verificou possivelmente devido às condições climáticas aquando da amostragem, estando os solos encharcados, diminuindo a porosidade do solo, e a quantidade de oxigénio mesmo nas camadas mais superficiais. Há ainda a considerar que pode haver um certo grau de sobreposição entre as duas contagens, uma vez que há a possibilidade de algumas que se contem como anaeróbias sejam anaeróbias facultativas, e algumas que se contem como aeróbias sejam aeróbias facultativas.

Com o aumento da profundidade verificou-se a diminuição do número de bactérias aeróbias e anaeróbias, o que está de acordo com o obtido por Boivin-Jahns *et al* (1996) em amostras de sedimentos argilosos numa mina na Bélgica em que demonstrou uma diminuição de densidade bacteriana em função da distância à superfície.

A diminuição do número de bactérias obtido pode estar relacionada com a disponibilidade de carbono orgânico (anexo 8.2., dados não publicados), uma vez que em solos argilosos devido à sua baixa porosidade os nutrientes estão disponíveis apenas através de difusão. A determinação do carbono orgânico total nas amostras de solos mostrou uma redução para cerca de 27% do valor à superfície 3 aos 20 cm de profundidade e para cerca de 5% dos 20 aos 50 cm de profundidade, no local MM03. No local MM11 verifica-se uma redução de carbono orgânico total para cerca de 31% dos 3 aos 20 cm de profundidade e para cerca de 6% dos 20 aos 50 cm de profundidade. No local MM12 verifica-se uma redução de carbono orgânico total para cerca de 19% dos 3 aos 20 cm de profundidade e de cerca de 13% dos 20 aos 50 cm de profundidade, podendo estas reduções explicar a diminuição da abundância bacteriana com o aumento da profundidade.

Em nenhum dos locais foi possível cultivar bactérias sulfato redutoras. Este facto poderá dever-se ao facto de estas amostras de solos possuírem quantidades de sulfatos muito baixas, ou devido ao tempo de incubação não ter sido suficiente. No entanto,

algumas bactérias desse grupo estão envolvidas em reacções de transformação de metais, designadamente, na metilação de mercúrio, pelo que a sua quantificação pode ser muito importante para a caracterização biológica de solos destinados a albergar um repositório de resíduos radioactivos, e à compreensão dos processos microbianos mais relevantes em cada contexto ambiental.

Numa perspectiva da diversidade bacteriana só foi possível para o local MM03, aquele onde também foram registados os valores mais elevados de abundância bacteriana estimada por uma abordagem dependente de cultivo. Considerando que a maior parte das bactérias presentes em solos naturais não é cultivável em laboratório, não é, por isso, possível concluir a comunidade bacteriana que está activamente envolvida em processos de transferência de materiais e energia no sedimento natural. No entanto, perfis de DGGE revelam uma diversidade apreciável de procariotas nas várias camadas de sedimento, o que pode ser útil em posteriores estudos em que uma diminuição de diversidade poderia funcionar como indicador da magnitude do impacto e da sua extensão espacial ao longo da coluna de sedimento.

Embora o ambiente sedimentar seja caracteristicamente muito heterogéneo, neste trabalho as sub-amostras de uma mesma profundidade mostraram, de um modo geral, maior semelhança entre si do que entre sub-amostras de uma outra camada de sedimento. Este facto pode ser interpretado como indicação de que existem comunidades bacterianas específicas associadas a cada profundidade estudada. As amostras das profundidades 0 a 10 cm e 30 a 40 cm possuem maior variabilidade, no entanto devido ao número limitado de amostras e ao reduzido número de descritores ambientais, não é ainda possível identificar quais os principais factores que neste ambiente particular, estão a afectar de forma mais determinante a estrutura da comunidade bacteriana.

4. Conclusões

Nas amostras de solos analisadas foram quantificados os teores microbianos cultiváveis e foram avaliadas quanto à sua diversidade estrutural comunidades bacterianas que podem actuar como agentes catalisadores dos processos físico-químicos resultantes de possíveis interacções com outros agentes presentes, nomeadamente, radionuclidos, contribuindo assim para a degradação das barreiras de protecção de um repositório de resíduos radioactivos.

Foi, ainda possível verificar que estas amostras possuem elevada diversidade e que cada camada estudada possui possivelmente comunidades específicas, o que pode ser útil em estudos de impacto ambiental. No entanto seria necessário obter resultados para as amostras dos outros dois locais estudados, e fazer um estudo comparativo entre os três locais.

6. Perspectivas Futuras

Será importante continuar a investigar quais os factores (pH, presença de água, temperatura, actividade específica do radionuclido estudado, condições de stress, resposta ao longo do tempo em amostras totais e fracções menores que 63, 36 e 20 micra, em função da dose de radiação aplicada) que regem as interacções entre as comunidades bacterianas existentes nos solos de onde foram tiradas as amostras e radionuclidos de especial importância no inventário dos resíduos radioactivos produzidos em Portugal, nomeadamente o ^{137}Cs .

7. Bibliografia

Andrade, E.; 2009; *Caracterização de geomateriais provenientes de depósitos de “Rana” para retenção de radiocésio*; Tese de Mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente; Departamento de Geologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Grupo Radioactividade Ambiente e Grupo Radioprotecção e Resíduos Radioactivos da Unidade de Protecção e Segurança Nuclear/Instituto Tecnológico e Nuclear;

Avery, S.V.; 1996; *Fate of Caesium in the environment: Distribution between the abiotic and biotic components of aquatic and terrestrial ecosystems*; Journal of Environmental Radioactivity; Vol. 30, No. 2: 139-171;

Beech, I. B.; Gaylarde, C. C.; 1999; *Recent advances in the study of biocorrosion – na overview*; Revista de Microbiologia; 30: 177-190;

Bellenger, J.P.; Staunton, S.; 2008; *Adsorption and desorption of ^{85}Sr and ^{137}Cs on reference minerals, with and without inorganic and organic surface coatings*; Journal of Environmental Radioactivity; 99: 831-840;

Boivin-Jahns, V.; Ruimy, R.; Bianchi, A.; Daumas, S.; Christen, R.; 1996; *Bacterial Diversity in a deep-subsurface clay environment*; Applied and Environmental microbiology; Vol 62, No9: 3405-3412;

Bolt, G.; Summer, M. & Kamphorst, A.; 1963; *A Study of the Equilibria Between Three Categories of Potassium in an Illitic Soil*; Soil Sci. Soc. Am.; 27:294-299;

Boon, N.; Windt, W. D.; Verstraete, W.; Top, E. M.; 2002; *Evaluation of nested PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants*; FEMS Microbiology Ecology; 39: 101-112;

Bossemeyer, D.; Schlösser, A.; Bakker, E. P.; 1989; *Specific Scesium transport via the Eschericia coli Kup (TrKD) K^+ uptake system*; Journal of Bacteriology; Vol. 171, No. 4: 2219-2221;

Chhabra, R.; Pleysier, J. & Cremers, A.; 1975; *The Measurement of the Cation Exchange Capacity and Exchangeable Cations in Soils: A New Method*; Internacional Clay Conference; p. 439-449.

Chiu, C. Y.; Lai, S. Y.; Lin, Y. M.; Chiang, H. C.; 1999; *Distribution of the radionuclide ^{137}Cs in the soils of a wet mountainous forest in Taiwan*; Applied Radiation and Isotopes; 50: 1097-1103;

DE Preter, P.; 1990; *Radiocesium Retention in the Aquatic, Terrestrial and Urban Environment: A Quantitative and Unifying Analysis*. Ph.D. Thesis, K. U. Leuven, Belgium.

Diosí, G.; Telegdi, J.; Farkas, G.; Gázsó, L. G.; Bokori, E.; 2003; *Corrosion influenced by biofilms during wet nuclear waste storage*; International Biodeterioration & Biodegradation, 51: 151-156;

Farkas, G.; Gázsó, L. G.; Diósi, G.; 2002; *Radiosensitivity of subterranean bacteria in the Hungarian upper permian siltstone formation*; Environmental radioactivity; 61: 233-239;

Fredrickson, J. K.; Balkwill, D. L.; 2006; *Geomicrobial processes and biodiversity in the deep terrestrial subsurface*; Geomicrobiology Journal; 23: 345-356;

Gadd, G. M.; 2000; *Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization*; Current Opinion in Biotechnology; 11: 271-279;

Gascoyne, S. S.; Sargent, F. P.; 1998; *The Canadian approach to microbial studies in nuclear waste management and disposal*; Journal of Contaminant Hidrology; 35: 175-190;

Gurtner, C. S.; Lubitz, W.; Rölleke, S.; 2003; *Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria*; Journal of Microbiological Methods; 52: 251-260;

HaiLei, W.; MianPing, Z.; XiaoXing, H.; 2007; *Cesium accumulation by bacterium Thermus sp. TibetanG7: hints for biomineralization of cesium-bearing geysers in hot springs in Tibet, China*; Chinese Science Bulletin, Vol. 52, No 19: 2680-2686;

Harris, K. A.; Hartley, J. C.; 2003; *Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service*; Journal of Medical Microbiology; 52: 685-691;

Heur, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E. M. H.; 1997; *Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of gene encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients*; Applied and Environmental Microbiology; Vol. 63, No 8: 3233-3241;

Kosareva, I. M.; Safonov, A. V.; Savushkina, M. K.; Ershov, B. G.; Kabakchi, S. A.; Revenko, Y. A.; Khafizov, R. R.; Bondin, V. V.; Nazina, T. N.; 2007; *Physicochemical and biological monitoring of deep repositories for liquid radioactive waste*; Atomic Energy; Vol. 103, No. 2: 615-622;

Madruga, M. J.; 1993; *Adsorption-Desorption Behaviour of Radiocaesium and Radiostrontium in Sediments*; Ph.D Thesis. K. U. Leuven, Belgium.

Martínez-Iñigo, M.J.; Pérez-Sanz, A.; Ortiz, I.; Alonso, J.; Alarcón, R.; García, P.; Lobo, M.C.; 2009; *Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR-DGGE profiles and β -Galactosidase activity as indicators of biological in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene vulgaris* (Moench) Garcke*; Chemosphere; 75: 1376-1381;

Muyzer, G.; Smalla, K.; 1998; *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*; Kluwer Academic Publishers; 73: 127-141;

Nakatsu, C. H.; 2007; *Soil microbial community analysis using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*; Soil Science Society of America Journal; Vol. 71; No 2: 562-571;

Nikolova, I; Johanson, K. J.; Clegg, S.; 2000; *The accumulation of ¹³⁷CS in the biological compartment of forest soils*; Journal of Environmental Radioactivity; 47: 319-326;

Papen, H.; Berg R. V.; 1998; *A Most Probable Number Method (MNP) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil*; Plant and Soil; 199: 123 – 130;

Parekh, N. R.; Poskitt, J. M.; Dodd, B. A.; Potter, E.D.; Sanchez, A.; 2008; *Soil microorganisms determine the sorption of radionuclides within organic soil systems*; Journal of Environmental Radioactivity; 99: 841-852;

Pedersen, K.; Ekendahl, S.; 1990; *Distribution and activity of Bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden*; Microbial Ecology; 20: 37-52;

Pedersen, K.; 2005; *Microorganisms and their influence on radionuclide migration on igneous rock environment*; Journal of Nuclear and Radiochemical sciences; Vol. 6, No 1: 11-15;

Saiki, R. K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A.; 1988; *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*; Science; Vol. 239: 487- 491;

Wauters, J.; Madruga, M.J.; Vidal, M. & Cremers, A.; 1996; *Solid Phase Speciation of Radiocaesium in Bottom Sediments*; The Science of the Total Environment ;187:121-130.

Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J.; 1991; *16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*; Journal of Bacteriology; Vol.173, No 2: 697-703;

West, J. M.; McKinley, I. G.; Neall; F. B.; Rochelle, C. A.; Bateman, K.; Kawamura, H.; 2006; *Microbiological effects on the Cavern Extended Storage (CES) repository for radioactive waste – a quantitative evaluation*; Journal of Geochemical Exploration; 90: 114-122;

Wilson, K. H.; Blitchington, R. B.; Greene, R. C.; 1990; *Amplification of bacterial 16S Ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction*; Journal of Clinical Microbiology; Vol. 28, No 9: 1942-1946;

8. Anexos

8.1. Protocolos

8.1.1 Extracção de microrganismos das amostras de solo

8.1.1.1. Precauções

Manusear as amostras em condições de assépsia, de modo a não haver contaminações.

8.1.1.2. Equipamento e reagentes necessários

Equipamentos

Balança
Frascos estéreis
Pipetas graduadas
Vortex

8.1.1. 3. Procedimento

- 1) Pesar 1 g de solo e colocar num frasco estéril contendo 10 ml de água destilada estéril;
- 2) Levar ao vortex durante aproximadamente 2 minutos;
- 3) Deixar depositar as partículas de solo durante cerca de 1 hora.

8.1.2. Teor de Bactérias Aeróbias Totais

8.1.2.1 Precauções

Manusear as amostras em condições de assépsia, de modo a não haver contaminações.

8.1.2.2. Equipamento e reagentes necessários

Equipamentos

Autoclave
Bico de Bunsen
Micropipetas
Tubos de ensaio

Reagentes

CASO Broth (Soybean Casein digest Broth, Casein-peptone soymeal-peptone broth) (Sigma-aldrich)

Água destilada

8.1.2.3. Procedimento

- 1) Pesar 30 g de meio de cultura desidratado e suspender em 1 l de água destilada;
- 2) Autoclavar a 121°C durante 15 minutos;
- 3) Deixar arrefecer até 45-50°C e distribuir 10 ml por tubo de ensaio;
- 4) Preparar diluições decimais das amostras, até à diluição 10^{-5} ;
- 5) Inocular 1 ml das diluições decimais das amostras nos tubos de ensaio, efectuando três réplicas para cada diluição;
- 6) Incubar a 32°C durante 24 horas;
- 7) Registrar os resultados como positivo ou negativo, conforme se verifique ou não crescimento bacteriano.

8.1.3. Teor de Bactérias Anaeróbias totais

8.1.3.1. Precauções

Manusear as amostras em condições de assépsia, de modo a não haver contaminações.

8.1.3.2. Equipamento e reagentes necessários

Equipamentos

Autoclave

Bico de Bunsen

Micropipetas

Tubos de ensaio

Reagentes

Thioglycollate Broth with Resazurine (Sigma Aldrich)

Água destilada

8.1.3.3. Procedimento

- 1) Pesar 29,75 g de meio de cultura desidratado e suspender em 1 l de água destilada;
- 2) Aquecer o meio em banho Maria até dissolver completamente;
- 3) Distribuir 10 ml de meio por tubos de ensaio com tampa;
- 4) Autoclavar a 121°C durante 15 minutos;
- 5) Fechar bem os tubos imediatamente a seguir a saírem da autoclave;
- 6) Preparar diluições decimais das amostras, até à diluição 10^{-4} ;
- 7) Inocular 1 ml das diluições decimais das amostras nos tubos de ensaio, efectuando três réplicas para cada diluição;
- 8) Incubar a 32°C durante 48 a 72 horas;
- 9) Registrar os resultados como positivo ou negativo, conforme se verifique ou não crescimento bacteriano.

8.1.4. Teor de Bactérias Sulfato Redutoras

8.1.4.1. Precauções

Manusear as amostras em condições de assépsia, de modo a não haver contaminações.

8.1.4.2. Equipamento e reagentes necessários

Equipamentos

Autoclave
Bico de Bunsen
Micropipetas
Tubos de ensaio

Reagentes

Sulfate API Agar (Sigma-aldrich)
Água destilada

8.1.4.3. Procedimento

- 1) Pesar 25,4 g de meio de cultura desidratado e suspender em 1 l de água destilada;
- 2) Adicionar 4 ml de solução de Lactato de Sódio a 60%;
- 3) Distribuir 10 ml de meio por tubos de ensaio com tampa;

- 4) Autoclavar a 121°C durante 15 minutos;
- 5) Fechar bem os tubos imediatamente a seguir a saírem da autoclave;
- 6) Preparar diluições decimais das amostras, até à diluição 10⁻⁴;
- 7) Inocular 1 ml das diluições decimais das amostras nos tubos de ensaio, efectuando três réplicas para cada diluição;
- 8) Incubar a 32°C durante 1 semana;
- 9) Registar os resultados como positivo ou negativo, conforme se verifique ou não crescimento bacteriano.

8.1.5. Extracção de DNA de amostras de solo

A extracção de DNA foi executada conforme protocolo fornecido com o Kit de extracção de DNA utilizado (UltraClean Soil DNA Isolation Kit)

8.1.5.1. Precauções

Manusear o Kit nas maiores condições de limpeza, utilizando luvas e evitando qualquer contacto da pele com soluções, ou material utilizado.

8.1.5.2. Equipamento necessário

- Aparelho *FastPrep*
- Microcentrífuga (10,000Xg)
- Micropipetas (volumes 50 µl – 1000 µl)
- *Vortex*

8.1.5.3. Componentes do Kit

- 50 tubos com 2 ml de *Bead Solution*
- 3.3 ml de solução S1
- 11 ml de solução IRS (Inhibitor Removal Solution)
- 14 ml de solução S2
- 72 ml de solução S3
- 16.5 ml de solução S4
- 3 ml de solução S5
- 50 *Spin Filters* em tubos de 2 ml
- 150 tubos (*ependorfs*) para colheita do DNA das amostras (2 ml)

Nota: Armazenamento do Kit à temperatura ambiente

8.1.5.4. Procedimento

- 1) Pesar 0.5 a 1g de solo das amostras para tubos com 2 ml de *Bead Solution*.
 - 2) Agitar no *vortex* gentilmente para misturar. Para padronizar procedimento colocar no *vortex* pelo menos 5seg.
 - 3) Verificar a solução S1 antes de usar, se esta estiver precipitado, aquecer ligeiramente a 60°C, até dissolver.
 - 4) Adicionar 60 µl da solução S1 e inverter várias vezes ou agitar brevemente no *vortex*.
 - 5) Adicionar 200 ml da solução IRS. Esta solução apenas é necessária se o DNA for utilizado para PCR.
 - 6) Colocar os tubos no Aparelho *FastPrep* e processar por 30 seg, à velocidade de 5.5 m/seg. Repetir operação.
 - 7) Centrifugar os tubos a 10,000Xg durante 30 seg.
 - 8) Transferir o sobrenadante para um microtubo *ependorf* limpo.
- Nota: Com 0,25g de solo são de esperar 400 a 450 µl de sobrenadante. Pode ainda conter algumas partículas de minerais.
- 9) Adicionar 250 µl de solução S2 e levar a agitar no *vortex* durante 5 seg. Incubar em gelo durante 5 minutos.
 - 10) Centrifugar os tubos a 10,000Xg durante 1 minuto.
 - 11) Evitando o *pellet* transferir 450 µl do sobrenadante para um *ependorf* limpo.
 - 12) Adicionar 900 µl de solução S3 ao sobrenadante e levar ao *vortex* durante 5 seg.
 - 13) Retirar aproximadamente 700 µl para um tubo com *Spin Filter* e centrifugar a 10,000Xg durante 1 minuto. Descartar o filtrado.
- Nota: para cada amostra é necessário efectuar este procedimento duas vezes.
- 14) Adicionar 300 µl da solução S4 e centrifugar a 10,000Xg, durante 30 seg.
 - 15) Descartar o filtrado.
 - 16) Colocar o *Spin Filter* cuidadosamente num *ependorf* novo.

Nota: Cuidado para não salpicar o filtro com solução S4.

17) Adicionar 50 µl da solução S5 exactamente no centro do filtro.

18) Centrifugar a 10,000Xg durante 30 seg.

19) Descartar o Spin Filter. O DNA está agora nos tubos, preparado para outras aplicações. Não são necessários passos adicionais. Armazenar os tubos com DNA a -20°C. A solução S5 não contém EDTA.

8.1.6. Polymerase Chain Reaction (PCR)

8.1.6.1 Precauções

Manusear os reagentes nas maiores condições de limpeza, utilizando luvas e evitando qualquer contacto da pele com soluções, ou material utilizado. As amostras de DNA não devem entrar na câmara de PCR, sendo executado o mix na câmara e adicionadas as amostras fora.

Os reagentes devem ser conservados à temperatura de -20°C, sendo descongelados à temperatura ambiente imediatamente antes de serem utilizados.

8.1.6.2. Equipamento e reagentes necessários

Equipamentos:

Câmara de PCR

Micropipetas

Termociclador

Tina de electroforese

Transiluminador de UV

Reagentes:

Acetamida

Água bidestilada

BSA 2mg/ml (*Bovine Serum Albumin*)

dNTP

MgCl₂

Primer 27F

Primer 968 GC

Primer 1401R

Primer 1494R

Tampão da *Taq Polymerase*(+KCL)

Taq Polymerase

Nota: O Cloreto de Magnésio e o Tampão são geralmente fornecidos com a enzima *Taq polymerase*, sendo as concentrações utilizadas especificadas pelo fabricante.

<i>Primer</i>	Sequência
27F	5'-AGAGTTTGAT...GCTCAG-3'
968GC	5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGG-3'
1401R	5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGA-3'
1494R	5'-CTACGGRTAC...TACGAC -3'

Tabela 1: Sequências dos *primers* usados.

8.1.6.3. Procedimento

PCR 1		PCR 2	
Reagente	Quantidade/amostra (µl)	Reagente	Quantidade/amostra (µl)
H₂O dd	13,25	H₂O dd	14,5
BSA	0,5	Acetamida	0,5
Tampão	2,5	Tampão	2,5
MgCl₂	3,0	MgCl₂	3,0
dNTP	3,0	dNTP	2,5
<i>Primer 27F</i>	0,25	<i>Primer 968GC</i>	0,25
<i>Primer 1494R</i>	0,25	<i>Primer 1401R</i>	0,25
<i>Taq Polymerase</i>	0,5	<i>Taq Polymerase</i>	0,5

Tabela 2: Reagentes e quantidade a utilizar por amostra, para a primeira reacção do *nested PCR*.

Tabela 3: Reagentes e quantidade a utilizar por amostra, para a segunda reacção do *nested PCR*.

- 1) Preparar o mix para PCR1 dentro da câmara de PCR, multiplicando as quantidades apresentadas na tabela 2 por $n+3$, sendo n o número de amostras (sendo o restante volume para 1 controlo positivo, um controlo negativo e para reserva);
- 2) Distribuir 24 μ l de mix em cada um dos tubos eppendorf para PCR;
- 3) Adicionar 1 μ l de amostra de DNA a cada um dos tubos. No tubo do controlo negativo não colocar amostra, no tubo de controlo positivo colocar 1 μ l amostra de controlo positivo. Pipetar várias vezes o mix com a amostra para homogeneizar;
- 4) Colocar os tubos no termociclador. Programar termociclador de acordo com as instruções do fabricante, de modo a que o programa seja: 5 min, 94°C; (45 seg, 94°C; 45 seg, 56°C, 1:30 min, 72°C) X 30; 10 min, 72°C; 15°C, ∞ ;
- 5) Após o primeiro PCR ter terminado preparar o mix para PCR 2 dentro da câmara de PCR, multiplicando as quantidades apresentadas na tabela 3 por $n+3$, sendo n o número de amostras (sendo o restante volume para 1 controlo positivo, um controlo negativo e para reserva);
- 6) Distribuir 24 μ l de mix em cada um dos tubos eppendorf para PCR;
- 7) Adicionar 1 μ l do produto do primeiro PCR a cada um dos tubos. No tubo do controlo negativo não colocar amostra, no tubo de controlo positivo colocar 1 μ l amostra de controlo positivo. Pipetar várias vezes o mix com a amostra para homogeneizar;
- 8) Colocar os tubos no termociclador. Programar termociclador de acordo com as instruções do fabricante, de modo a que o programa seja: 4 min, 94°C; (1 min, 95°C; 1 min, 53°C; 1:30 min, 72°C) X 34; 7 min, 72°C; 15°C, ∞ ;
- 9) Montar o molde para gel de agarose, colocando os pentes para formar os poços e vedar com fita autocolante;
- 10) Preparar um gel de agarose a 0,8%, juntando a 150 ml de tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), 1,2g de agarose. Levar a cozer no microondas. Deixar arrefecer até a temperatura ser tolerável na mão, adicionar 10 μ l de Brometo de Etídio e agitar;
- 11) Colocar o gel no molde e aguardar que solidifique; Após solidificar retirar os pentes e a fita autocolante cuidadosamente e colocar o gel na tina de electroforese contendo TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). Os poços devem ficar do lado do eléctrodo negativo;

- 12) Misturar 1 µl de tampão de carregamento com 5 µl de produto do segundo PCR e carregar os poços do gel;
- 13) Ligar a fonte de alimentação de modo a aplicar uma voltagem de 100V durante 20 minutos;
- 14) Colocar o gel no transiluminador de UV e verificar se existem bandas de DNA.
Nota: Caso não se visualizem bandas de DNA repetir o PCR para essas amostras.

8.1.7. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) dos produtos de amplificação

8.1.7.1 Precauções

Manusear os reagentes nas maiores condições de limpeza, utilizando luvas e evitando qualquer contacto da pele com soluções, ou material utilizado

8.1.7.2. Equipamento e reagentes necessários

Equipamentos:

Bomba Peristáltica
Gradient Maker
Micropipetas
Proveta de 20 ml
Tanque de DGGE e fonte de alimentação
Vidros, borracha e espessadores para DGGE

Reagentes:

Ácido acético
Acrilamida
Água Milli-Q
Alcool etílico
APS
Etanol
Formamida
Formol
Hidróxido de Sódio
Marcador/Standard de DGGE
Nitrato de Prata

Solução Stop
TAE 50X
Tampão de carga para DGGE
TEMED
Ureia

8.1.7.3. Procedimento

Preparação dos vidros

- 1) Limpar cuidadosamente os vidros com álcool etílico, de ambos os lados;
- 2) Colocar a borracha em volta de um dos vidros, e colocar o outro vidro de modo a que a parte menor da borracha fique entre os dois vidros;
- 3) Prender os vidros com as molas, duas em cada lado e duas por baixo;
- 4) Colocar entre os vidros os espessadores, ficando nas extremidades laterais, sem deixar folga entre os espessadores e a borracha;

Preparação do gel

- 1) Preparar duas soluções, volume de 14 ml cada, de para formar o gradiente 60% - 32%, de acordo com as seguintes proporções:

	High (60%)	Low (32%)
TAE 50X	280 µl	280 µl
Formamida	3,36 ml	1,792 ml
Acrilamida	4,2 ml	2,8 ml
Ureia	3,54 g	1,88 g
Água milli-Q	Até perfazer 14 ml	Até perfazer 14 ml

Tabela 4: Reagentes e respectivas proporções para preparar gel de DGGE com gradiente (60% - 32%)

Polimerização do gel

- 1) Lavar o “gradient maker” com água destilada. Verificar se a mangueira que liga à bomba peristáltica está desobstruída; Verificar se as torneiras do “gradient maker” estão fechadas.
- 2) Adicionar 85µl de APS e 30µl de TEMED a cada solução;
- 3) Homogeneizar as soluções;
- 4) Verter a solução High para o poço respectivo do “gradient maker”. Verter a solução Low. Ligar a agitação. Ligar a bomba peristáltica;
- 5) Abrir lentamente a torneira da solução High. Verificar se há fluxo;
- 6) Abrir lentamente a torneira da solução Low. Verificar se a agitação não é demasiado elevada (de modo que o nível da solução High seja sempre inferior ao da solução Low). Verificar se há refluxo. Se houver fechar lentamente a torneira e abrir novamente;
- 7) À medida que o gel flui nos vidros verificar se não há fugas;
- 8) No final da adição das soluções colocar os pentes lentamente entre os vidros, certificando que não fiquem bolhas de ar;
- 9) Entretanto colocar o tampão do tanque de electroforese a aquecer.

Lavagem do gel

- 1) Após a polimerização do gel (cerca de 60 minutos) remover lentamente o pente e lavar os poços com o tampão previamente aquecido.

Preparação das amostras e carregamento

- 1) Num bocado de parafilm dispor 5 µl de tampão de carga para DGGE em quantidade suficiente para a totalidade das amostras e marcador/standard de DGGE;
- 2) Adicionar amostra (volume variável entre 3 - 10µl) ao tampão de carga. Misturar bem com a micropipeta;
- 3) Colocar a frame com os vidros contendo o gel polimerizado no tanque de DGGE contendo o tampão previamente aquecido;

- 4) Carregar a mistura de amostra com tampão de carga nos poços do gel;
- 5) Proceder à corrida a 130V durante 16 horas.

Coloração do gel de DGGE

- 1) Após corrida remover cuidadosamente os géis individualmente para uma tina plástica contendo aproximadamente 150 ml de solução de fixação. Agitar durante 10-15 minutos;
- 2) Retirar a solução de fixação e adicionar aproximadamente 150 ml de solução de coloração. Agitar aproximadamente 15 minutos;
- 3) Retirar a solução de coloração e lavar com água Milli-Q. Adicionar aproximadamente 150 ml de solução de desenvolvimento. Incubar o gel até as bandas começarem a surgir;
- 4) Retirar a solução de desenvolvimento. Lavar com água Milli-Q.
- 5) Adicionar aproximadamente 150 ml de solução STOP.

Solução de Coloração	
Ácido Acético	750 µl
Etanol	15 ml
Nitrato de Prata	0,3 g
Água Milli-Q	Perfazer até 150 ml

Tabela 5: Reagentes e quantidades a utilizar na solução de coloração.

Solução de Desenvolvimento	
Hidróxido de Sódio	50 ml
Formol	405 µl
Água Milli-Q	Perfazer até 150 ml

Tabela 6: Reagentes e quantidades a utilizar na solução de desenvolvimento.

8.2. Teores de Matéria Orgânica

REF	COT (%)	0-3cm	3-20cm	20-50cm
3A	11,2	11,2		
3B	3,0		3	
3C	0,6			0,6
11A	4,8	4,8		
11B	1,5		1,5	
11C	0,3			0,3
12A	5,9	5,9		
12B	1,1		1,1	
12C	0,8			0,8

Tabela 7: Carbono Orgânico Total (%) determinado em amostras dos locais MM03, MM11 e MM12

8.3. pH do solo

REF	pH	0-3cm	3-20cm	20-50cm
3A	5,5	5,5		
3B	5,3		5,3	
3C	5,4			5,4
11A	6,0	6		
11B	6,1		6,1	
11C	6,3			6,3
12A	6,2	6,2		
12B	6,4		6,4	
12C	6,7			6,7

Tabela 8: pH determinado em amostras dos locais MM03, MM11 e MM12

8.4. Percentagem de fracção argilosa

REF	%<2µm	0-3 cm	3-20cm	20-50cm
3A	13,4	13,4		
3B	14,4		14,4	
3C	15,5			15,5
11A	17,5	17,5		
11B	17		17	
11C	12,5			12,5
12A	13,9	13,9		
12B	22,6		22,6	
12C	22,2			22,2

Tabela 9: Percentagem de fracção argilosa determinada em amostras dos locais MM03, MM11 e MM12

8.5. Composição elementar

	3C (<63µm)	3D(rocha)	11D(rocha)	12D(rocha)
Si (%)	20,62	24,34	21,75	20,58
Mg (%)	3,63	2,67	13,65	13,71
K (%)	0,20	0,15	<LD	<LD
Al (%)	6,18	5,78	0,34	0,53
Ca (%)	1,46	6,31	0,64	0,20
Cr (%)	0,11	0,02	0,23	0,27
Fe (%)	9,51	5,77	6,38	6,86
Ni (%)	0,19	0,01	0,31	0,26

Tabela 10: Composição elementar parcial determinada em amostras dos locais MM03, MM11 e MM12