

## **PROJETO RIBEIRÃO DO SOLDADO**

resgate dos recursos naturais e da história da comunidade

### **ECOLMEIA – BASF**

Termo Aditivo N. 001/21, Convênio FSA N. 001/2020, Processo FSA n. 12.395/2020, firmado entre a Fundação Santo André e a ORGANIZAÇÃO DA SOCIEDADE CIVIL DE INTERESSE PÚBLICO ECOLMEIA.

**Local do projeto:** Bairro Botujuru, São Bernardo do Campo/SP

**Período de realização:** agosto/21 a janeiro/22

### **Participação da FSA**

#### **ESTUDO SOBRE MICROORGANISMOS TERRESTRES**

##### **Participantes**

##### **Professores**

Marcia Zorello Laporta

Priscila Reina Siliano da Silva

Marcia Teixeira Garcia

##### **Alunos**

Ana Beatriz Sanches

Juliana Aparecida Carvalho Rossi

Gabriela Villa Marim

Roberta Goes da Silva

## **INTRODUÇÃO**

Com o objetivo de estudar o microbioma terrestre do local do projeto, Bairro Botujuru, São Bernardo do Campo, São Paulo, foram coletadas e analisadas amostras de solo e amostras de água encontrada na parte terrestre investigada, com vistas investigar bactérias e fungos presentes nas amostras de solo e de protozoários e outros componentes da microfauna nas amostras de água.

## PROCEDIMENTOS E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### 1ª Atividade - Demarcação dos pontos de coleta – 16/10/2021

Participação: equipe da Fundação Santo André e equipe da EColmeia (fotografia 1).

Fotografia 1 – Participantes da atividade de demarcação dos pontos de coleta.



Foram demarcados 15 pontos para a coleta das amostras de solo e de água presente no solo. Foram obtidas as coordenadas geográficas dos pontos com GPS Garmin Etrex 22 X (tabela 1).

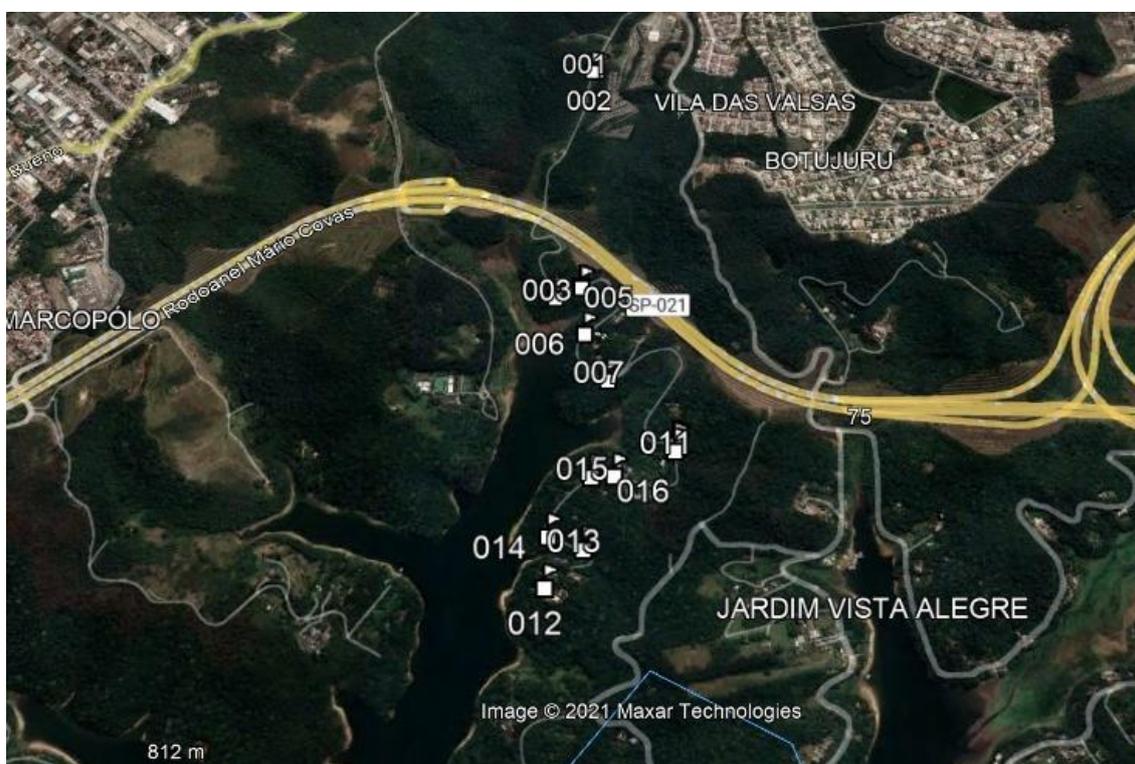
Tabela 1 – Ponto de coleta e coordenadas geográficas.

PONTOS	COORDENADAS
01	S23° 45.147' W46° 33.614'
02	S23° 45.147' W46° 33.605'
03	S23° 45.591' W46° 33.669'
04	S23° 45.569' W46° 33.627'
05	S23° 45.572' W46° 33.625'
06	S23° 45.655' W46° 33.618'
07	S23° 45.735' W46° 33.578'
08	S23° 45.841' W46° 33.468'
09	S23° 45.840' W46° 33.469'

10	S23° 45.838' W46° 33.469'
11	S23° 45.851' W46° 33.468'
12	S23° 46.061' W46° 33.672'
13	S23° 46.004' W46° 33.614'
14	S23° 45.985' W46° 33.669'
15	S23° 45.893' W46° 33.603'
16	S23° 45.891' W46° 33.566'

Os dados do GPS Garmin Etrex 22 X são sobrepostos no Google Earth imagens e o traçado foi feito automaticamente por meio do satélite conectado ao aparelho (fotografias 2 a 4 e 8 a 13).

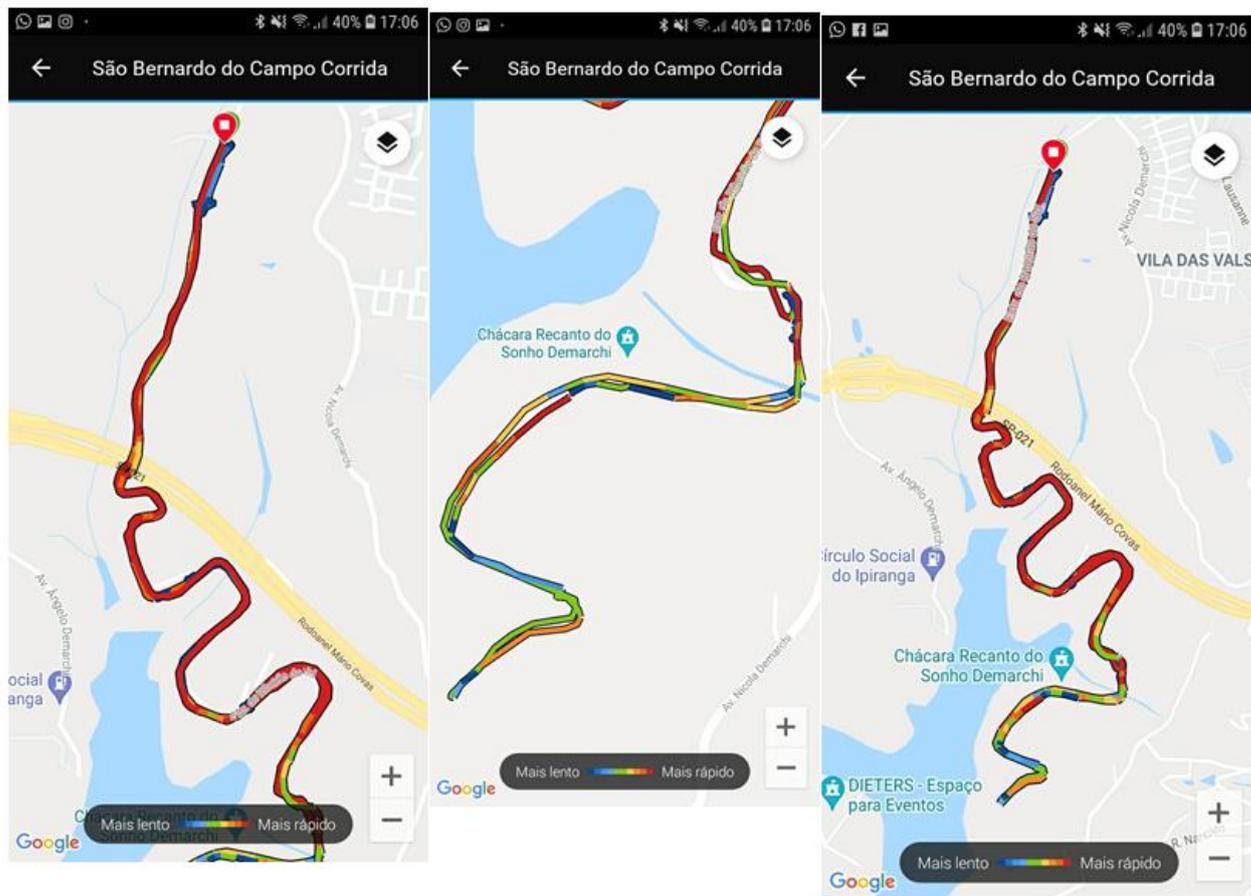
Fotografia 2 - Visão geral dos pontos demarcados



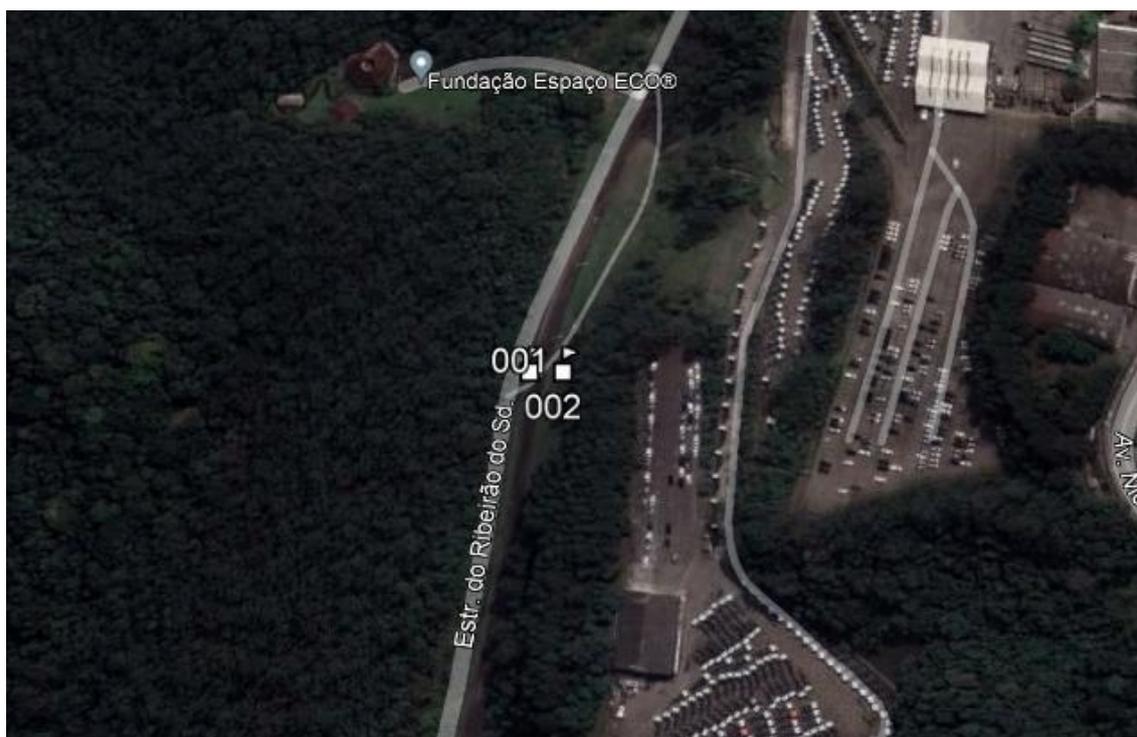


O trajeto percorrido também foi demarcado com auxílio do GPS Garmin forerunner 45 (Fotografias 5 a 7).

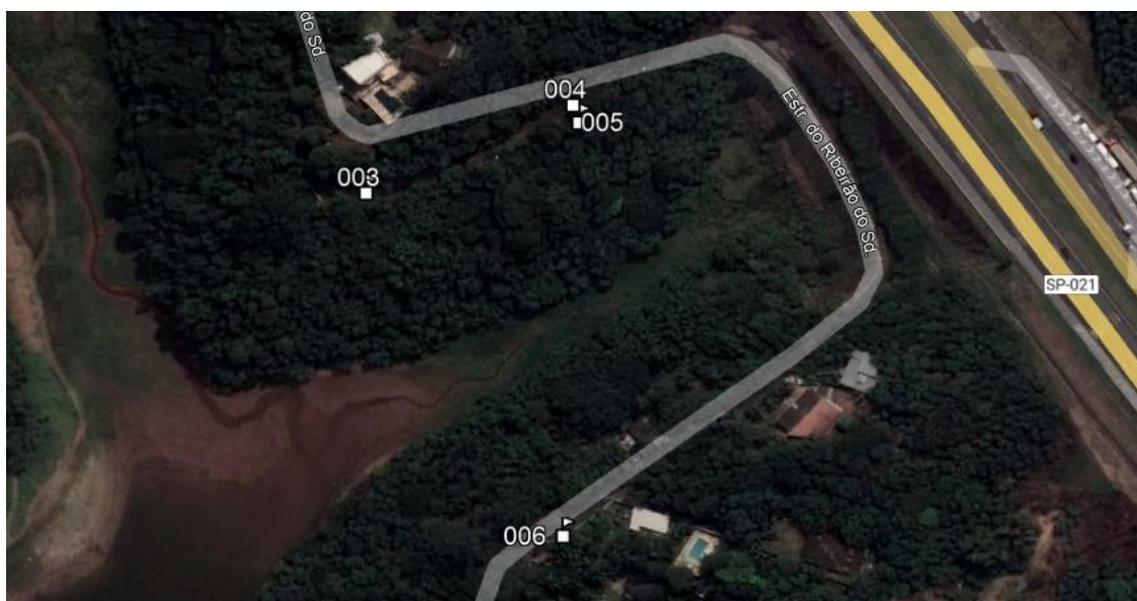
Fotografia 5 - Visão geral do trajeto dos pontos



Fotografia 6 - Pontos 1 e 2



Fotografia 7 - Pontos 3, 4, 5 e 6





Fotografia 10 - Pontos 12 a 14



Fotografia 11 - Pontos 15 e 16



**2ª Atividade – Coleta das amostras de solo e de água – 25/10/2021**

Participação da equipe da Fundação Santo André, sob a coordenação da Profa. Marcia Teixeira Garcia.

**Procedimento para a coleta das amostras de solo**

As amostras foram retiradas do solo, em profundidade de até 10 cm. Os pontos de coleta, previamente demarcados, consideraram características diversas, como proximidade a residências, locais de mata fechada, local com trajeto de água de chuva. Foram coletados cerca de 100g de solo, com auxílio de uma colher estéril. A amostra foi armazenada em um recipiente estéril, com tampa. As amostras foram acondicionadas e mantidas em geladeira de isopor, com bolsa de gelo, para o transporte para o laboratório de Biologia/Microbiologia da FSA.

**Procedimento para a coleta de água encontrada no ambiente terrestre**

As amostras de água foram coletadas com pipeta pasteur estéril e transferidas para frascos estéreis com tampa. As amostras foram acondicionadas em geladeira de isopor, com bolsa de gelo, para o transporte para o laboratório de Biologia/Microbiologia da FSA.

As fotografias 12 a 34 apresentam os pontos demarcados onde foram realizadas as coletas de amostras de solo e de água.

Fotografia 12 - Ponto 1 – Amostra de solo



Fotografia 13 - Ponto 2 – Amostra de água (foram colhidas duas amostras – 2 e 19)



Fotografia 14 - Ponto 3 – Amostra de solo



Fotografia 15 - Ponto 4 – Amostra de solo e de água



Fotografia 16 - Ponto 5 – Amostra de solo



Fotografia 17 - Ponto 6 – Amostra de solo (solo rochoso e líquen) e de água



Fotografia 18 - Ponto 7 – Amostra de solo



Fotografia 19 - Ponto 8 – Amostra de solo



Fotografia 20 - Ponto 9 – Amostra de solo e de água



Fotografia 21 - Ponto 10 – Amostra de solo



Fotografia 22 - Ponto 11 – Amostra de solo e água



Fotografia 23 - Ponto 12 – Amostra de solo e de água



Fotografia 24 - Ponto 13 – Amostra de solo



Fotografia 25 - Ponto 13 – Amostra de água



Fotografia 26 - Ponto 14 – Amostra de solo e de água



Fotografia 32 - Ponto 15 – Amostra de solo



Fotografia 33 – Ponto 17 (ponto extra) – coleta de água - planta – bananeira (foram coletadas duas amostras (17 e 18)



Fotografia 34 - Ponto 20 (ponto extra) - coleta de solo - musgo



- **Determinação da temperatura**

A temperatura do solo foi medida no momento da coleta, com auxílio de um termômetro Inconterm modelo TP 101 (fotografia 35). Os resultados são apresentados na tabela 2.

Fotografia 35 - Termômetro Inconterm TP 101



Tabela 2 – Temperatura do solo no local da coleta

Ponto	Temperatura (°C)	Ponto	Temperatura (°C)
1	18,5	9	17,3
2	(água)	10	16,6
3	18,9	11	16,4
4	16,5	12	16,1
5	18,1	13	16,7
6	Não medido (Solo rochoso com líquen)	14	16,9
7	20,5	15	16,8
8	18,1	20	Não medido (Musgo)

### 3ª Atividade – Análise das amostras – a partir do dia 25/10/2021

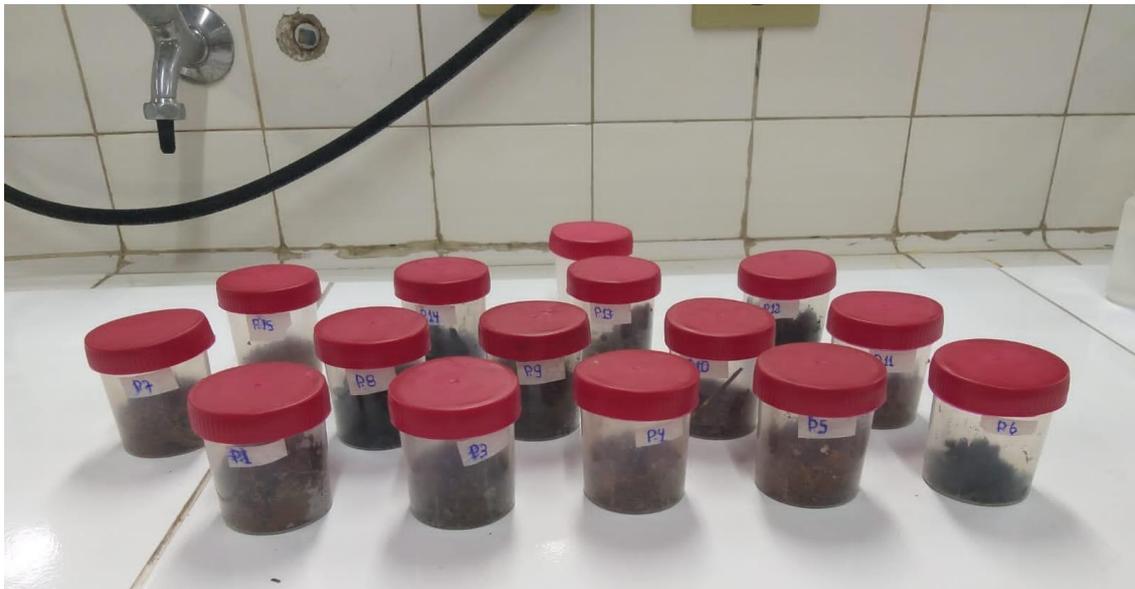
As amostras coletadas (tabela 3) foram transportadas em geladeira de isopor, com bolsa de gelo, ao laboratório de Biologia/Microbiologia do Centro Universitário Fundação Santo André e processadas no mesmo dia da coleta.

As amostras de solo, totalizando 15 amostras, são apresentadas na fotografia 36 e as de água, totalizando 11 amostras, são apresentadas na fotografia 37.

Tabela 3 – Amostras coletadas

Ponto	Amostra	Ponto	Amostra
1	solo	11	água e solo
2	água	12	água e solo
3	solo	13	água e solo
4	água e solo	14	água e solo
5	solo	15	solo
6	água e solo	16	água (descartado)
7	solo	17	água
8	solo	18	água
9	água e solo	19	água
10	solo	20	solo

Fotografia 36 – Amostras de solo: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 20



Fotografia 37 – Amostras de água: 2, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18 e 19.



## PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SOLO E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

- **Diluição da amostra em salina**

Alíquotas de 10 g de solo foram suspendidas em 90 mL de solução NaCl 0,85% estéril. Após agitação vigorosa e decantação da mistura, foram realizados os procedimentos de análise (fotografia 38).

Fotografia 38 – Amostras de solo diluídas em salina



- **Determinação do pH das amostras de solo**

O pH das amostras foi determinado após diluição em 90mL de salina estéril em pHgâmetro Quimis. Os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Amostras de solo e pH

Ponto	pH	Ponto	pH
1	8,32	10	4,42
3	6,40	11	3,80
4	6,19	12	6,79
5	6,89	13	7,02
6	6,88	14	6,28
7	4,37	15	3,78
8	7,25	20	3,0
9	6,93		

**Diluição seriada para o plaqueamento**

As amostras suspensas em salina foram diluídas da seguinte maneira: alíquotas de 0,1 mL da suspensão de solo em NaCl 0,85% estéril foram transferidas para um eppendorf contendo 0,9mL de NaCl 0,85% estéril, homogeneizada e então 0,1 mL dessa primeira diluição ( $10^{-1}$ ) foi transferido para um segundo eppendorf contendo 0,9 mL de NaCl 0,85% estéril, e assim, sucessivamente, até o oitavo eppendorf.

**Plaqueamento**

**Para contagem de bactérias:** alíquotas de 0,1mL das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  foram semeadas por espalhamento, em placas contendo ágar nutriente (Himedia), com auxílio de alças de vidro estéreis. As placas foram incubadas a 37°C, durante 72 horas.

**Para o estudo de fungos:** alíquotas de 0,1mL das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  foram semeadas por espalhamento, em placas contendo ágar Sabouraud (Himedia), com auxílio de alças de vidro estéreis. As placas foram incubadas a 37°C, durante 5 dias.

**Leitura das placas**

As fotografias 39 a 44 apresentam os resultados do plaqueamento. As placas com meio de cultura apresentaram diferentes tipos de colônias de bactérias e fungos, algumas delas bem típicas dos microrganismos comumente encontradas no solo.

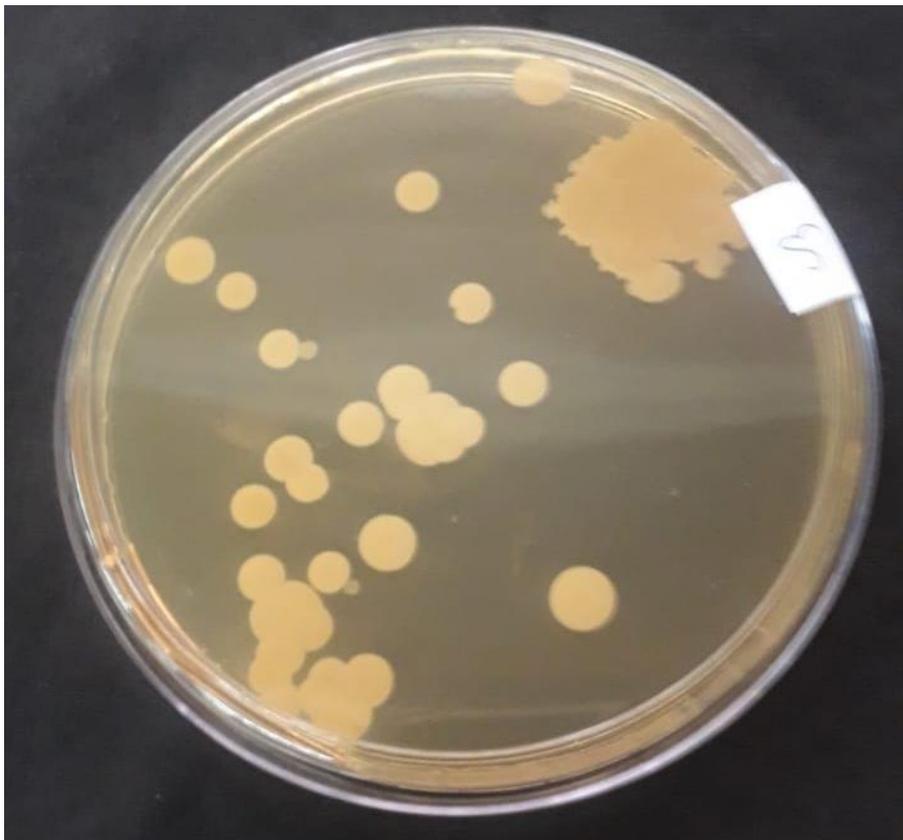
Fotografia 39 – Placa com ágar nutriente, mostrando detalhes de colônias típicas de microrganismos do solo do ponto 11.



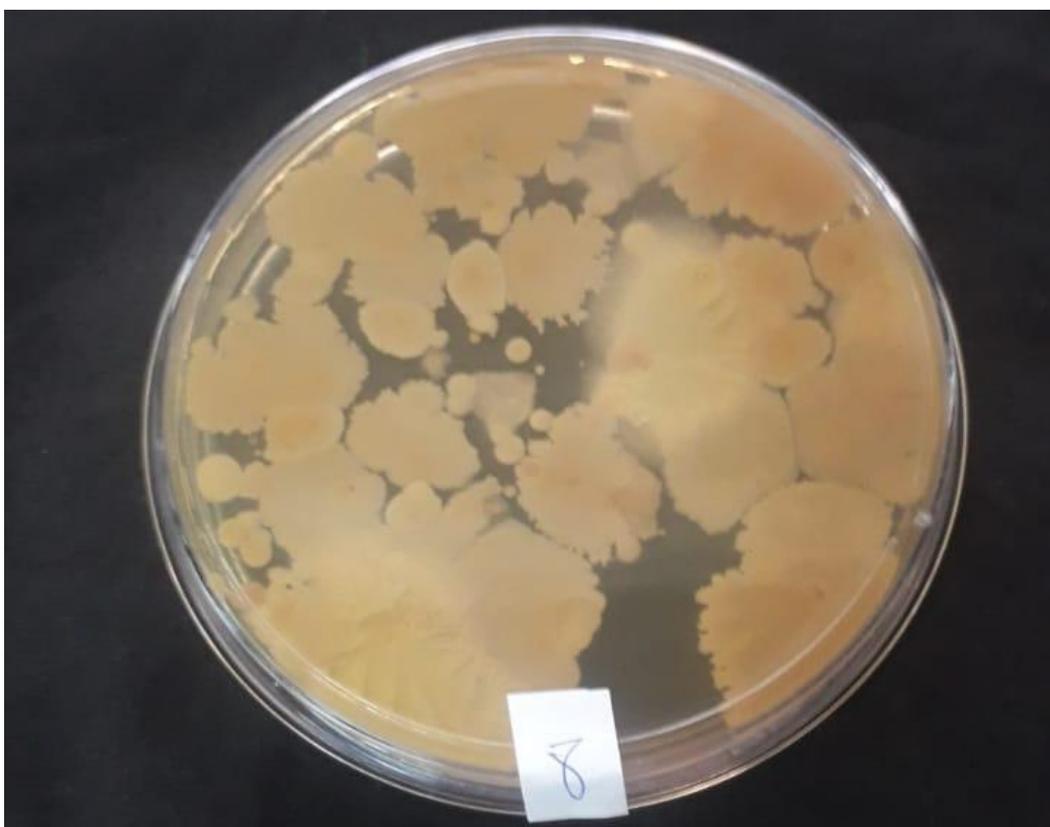
Fotografia 40 - Colônias desenvolvidas a partir da amostra de solo do ponto 3.



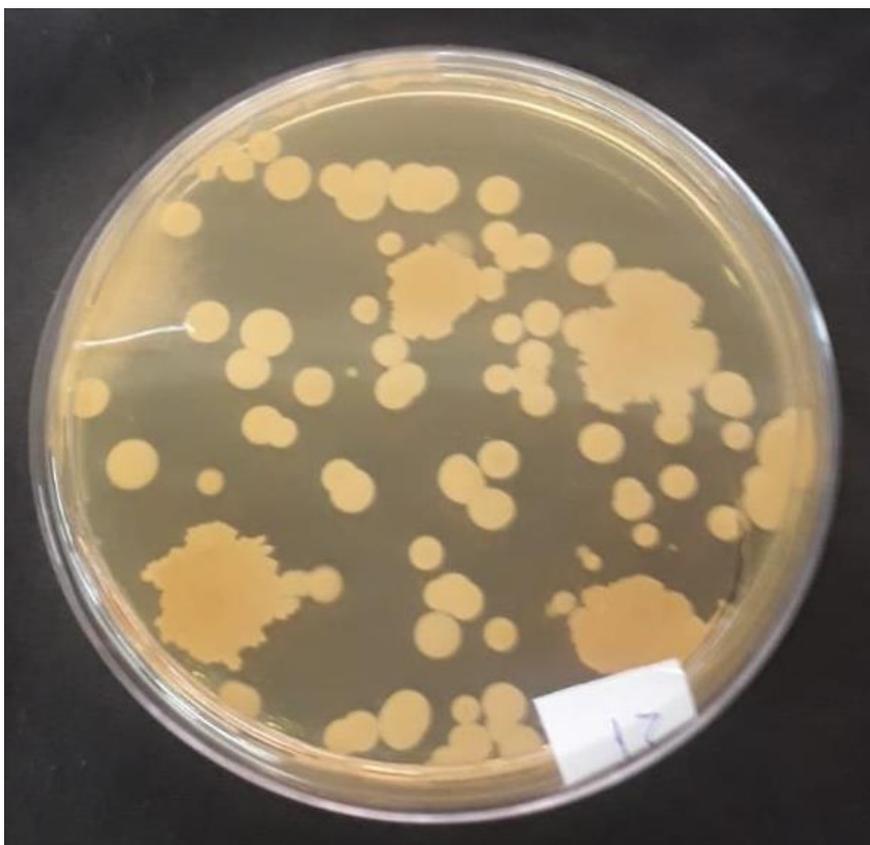
Fotografia 41 - Colônias desenvolvidas a partir da amostra de solo do ponto 5.



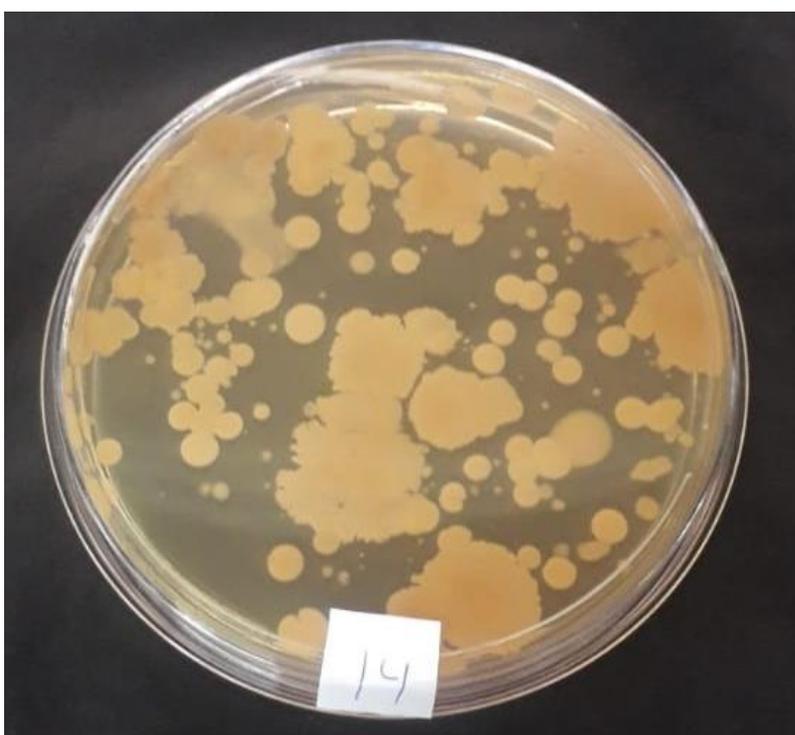
Fotografia 42 - Colônias desenvolvidas a partir da amostra de solo do ponto 8.



Fotografia 43 - Colônias desenvolvidas a partir da amostra de solo do ponto 12.



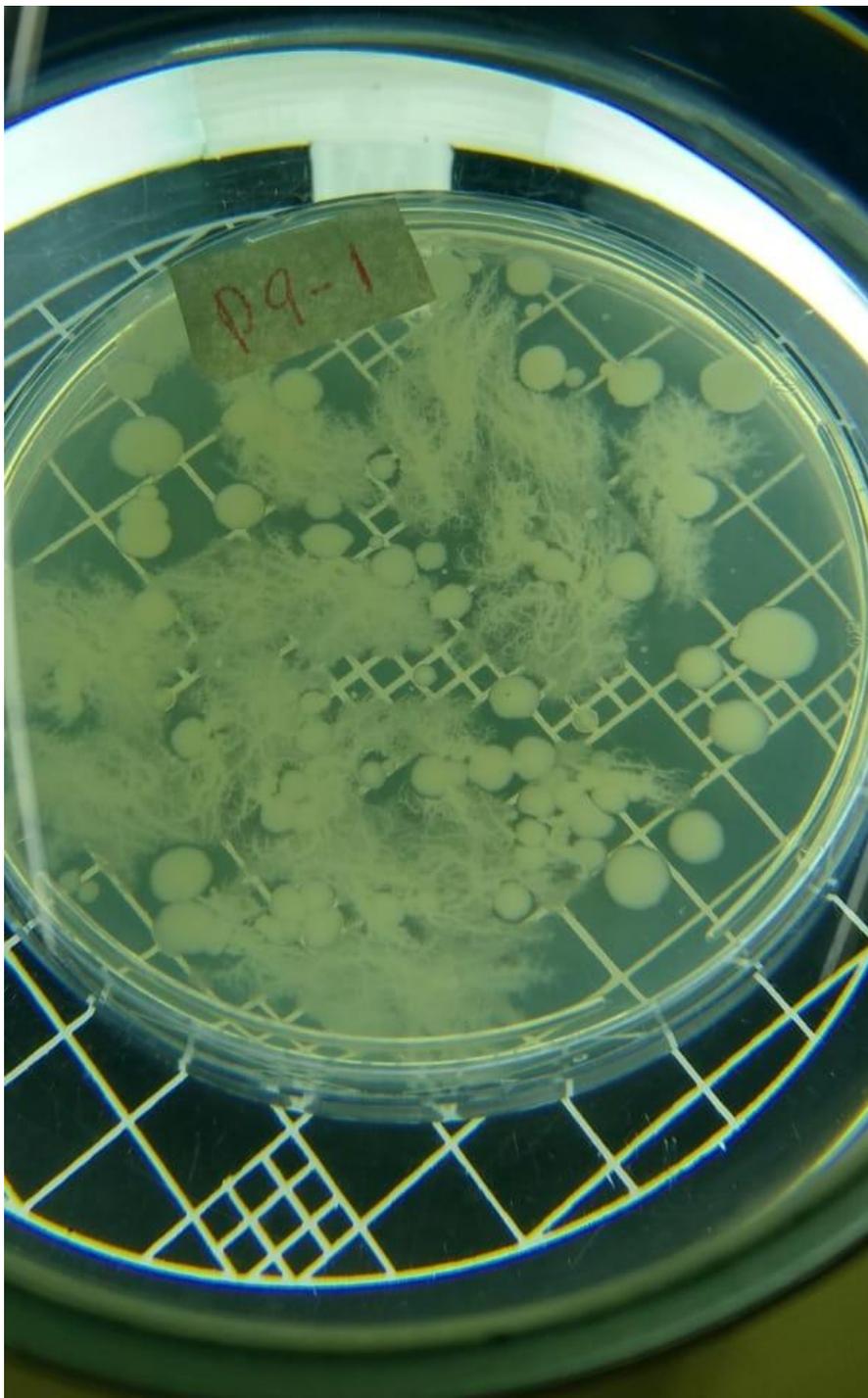
Fotografia 44 - Colônias desenvolvidas a partir da amostra de solo do ponto 14.



### Contagem de colônias nas placas de ágar nutriente

As placas com ágar nutriente forma submetidas à contagem de colônias (Fotografia 45)

Fotografia 45 – Contagem de colônias na placa com ágar nutriente



Para a estimativa das Unidades Formadoras de Colônias – UFC, foram consideradas as contagens entre 30 a 300 colônias e utilizado o seguinte cálculo:

**Número de colônias contadas na placa com ágar nutriente X Fator de Diluição X 10 (porque foi plaqueado 0,1 mL)**

Os resultados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Estimativa do número de UFC/g de solo

Ponto	pH	Contagem de colônias	UFC/g de solo
1	8,32	Não houve crescimento	Não houve crescimento
3	6,40	60 (na diluição $10^{-1}$ )	$6 \times 10^3$
4	6,19	43 (na diluição $10^{-1}$ )	$4,3 \times 10^3$
5	6,89	13	Não foi considerado
6	6,88	202 (na diluição $10^{-1}$ )	$2,02 \times 10^4$
7	4,37	Não houve crescimento	Não houve crescimento
8	7,25	53 (na diluição $10^{-1}$ )	$5,3 \times 10^3$
9	6,93	Incontável	Incontável
10	4,42	11	Não foi considerado
11	3,80	Incontável	Incontável
12	6,79	34 (na diluição $10^{-1}$ )	$3,4 \times 10^3$
13	7,02	31 (na diluição $10^{-1}$ )	$3,1 \times 10^3$
14	6,28	42 (na diluição $10^{-1}$ )	$4,2 \times 10^3$
15	3,78	12	Não foi considerado
20	3,0	Não houve crescimento	Não houve crescimento

### Coloração das bactérias isoladas das amostras de solo

Após a contagem das colônias, foi feita a coloração de Gram e as lâminas preparadas foram observadas ao microscópio, com objetiva de imersão e aumento de 1000X (fotografias 46 a 48).

Fotografia 46 – Coloração de Gram



Fotografia 47 – Coloração de Gram



Fotografia 48 – Leitura ao microscópio

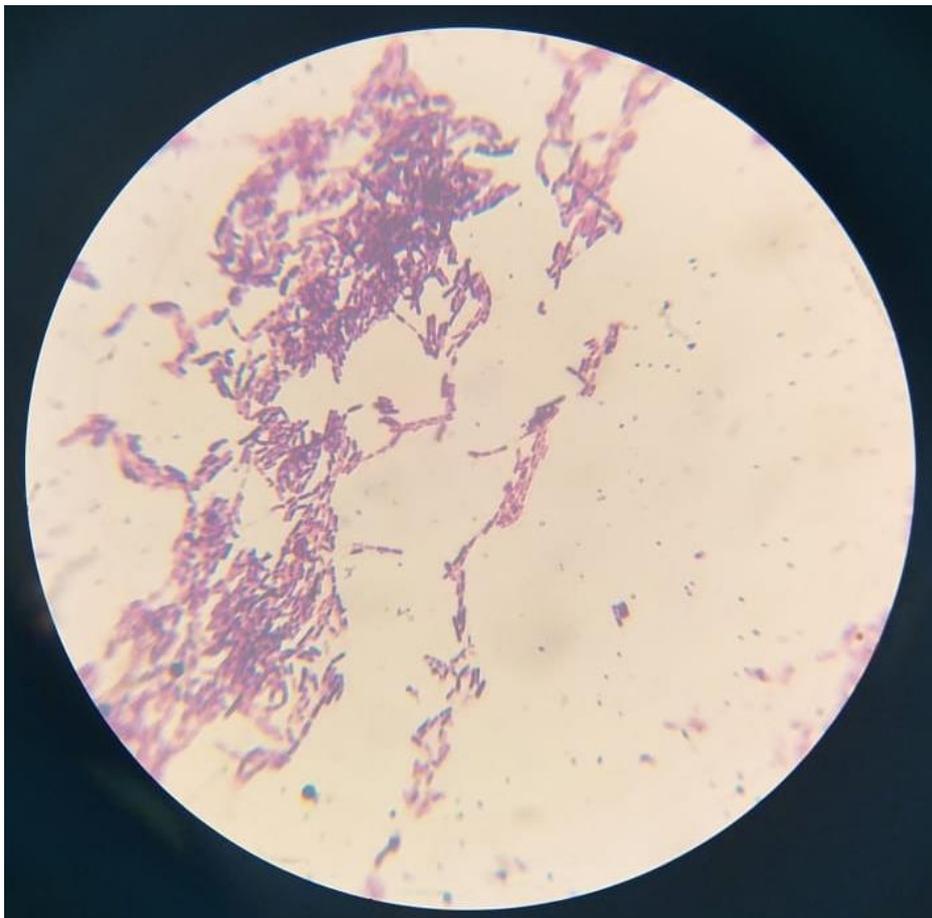


Fotografia 49 – Leitura ao microscópio

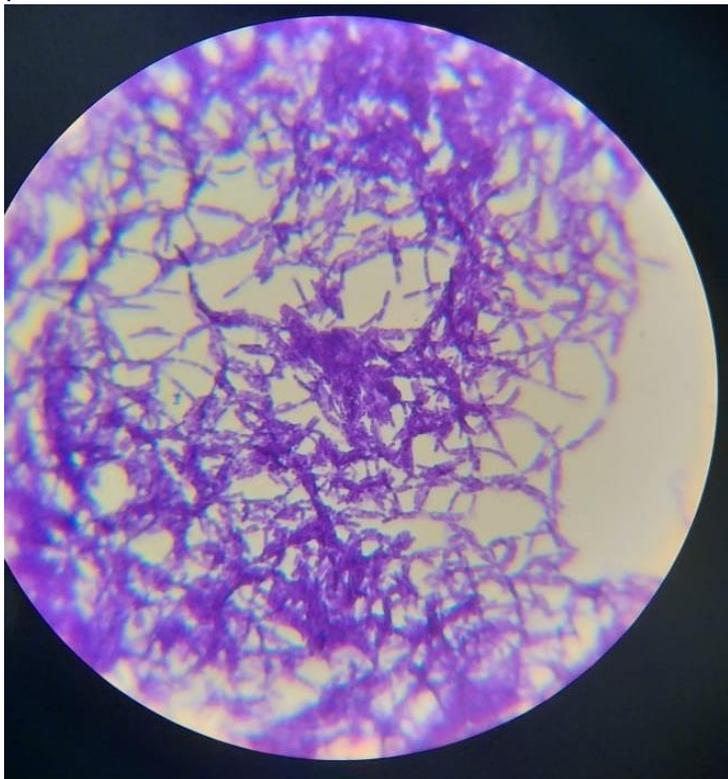


As fotografias 50 a 55 mostram as bactérias observadas ao microscópio, após a coloração de Gram (ampliação 1000X). As bactérias observadas são típicas do solo.

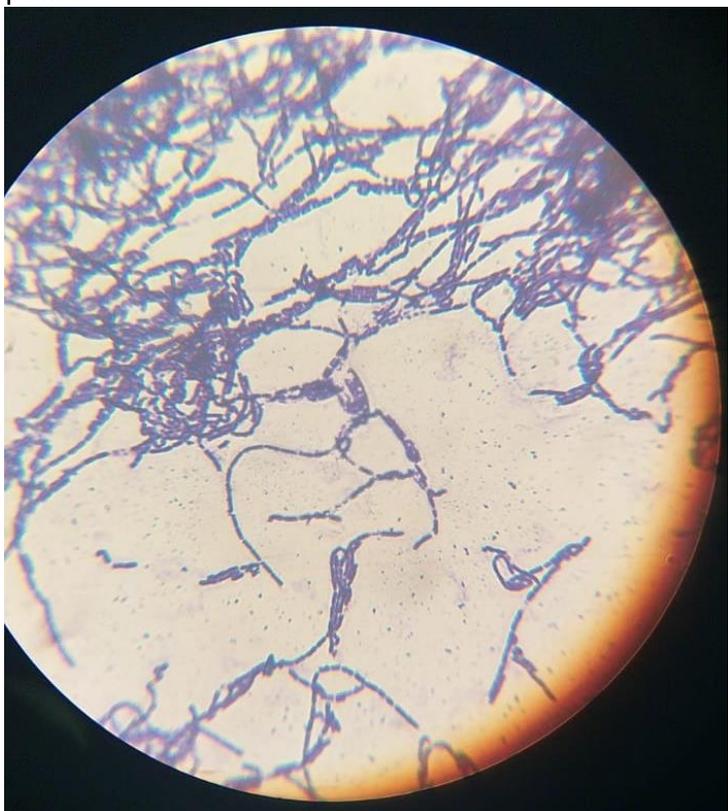
Fotografia 50 - Bacilos gram positivos observados em colônias obtidas nas amostras dos pontos 3, 5 e 6



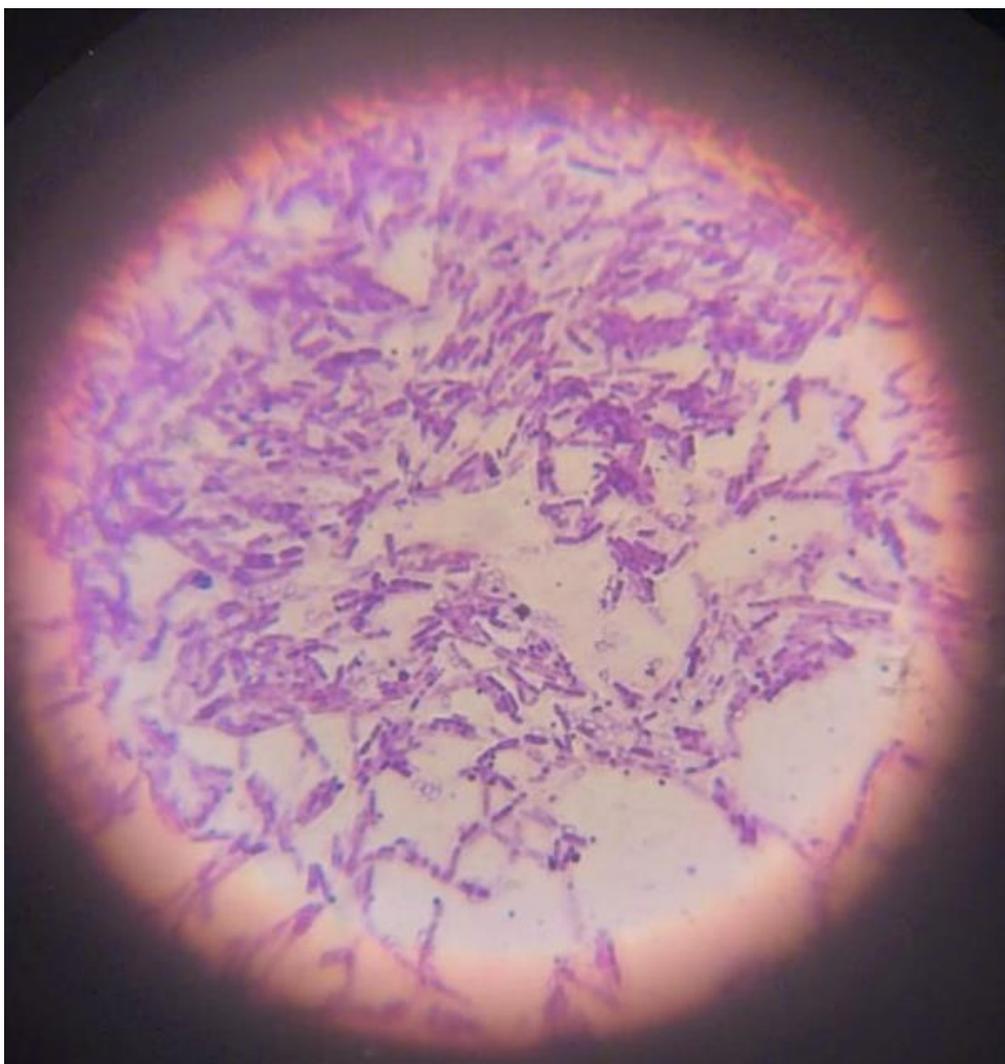
Fotografia 51 - Bacilos gram positivos observados em colônias obtidas nas amostras dos pontos 3 e 6



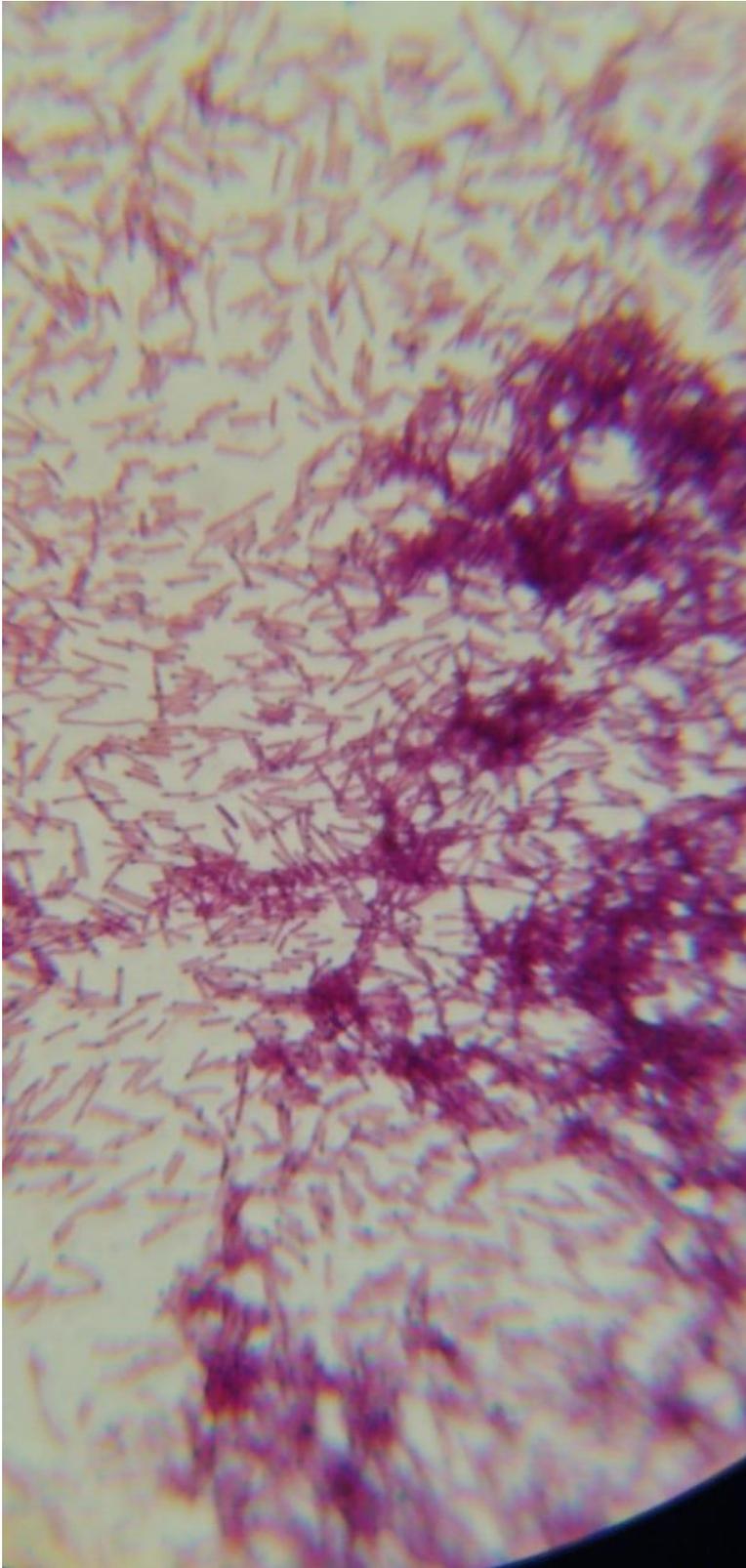
Fotografia 52 - Bacilos gram positivos observados em colônias obtidas nas amostras dos pontos 4 e 5.



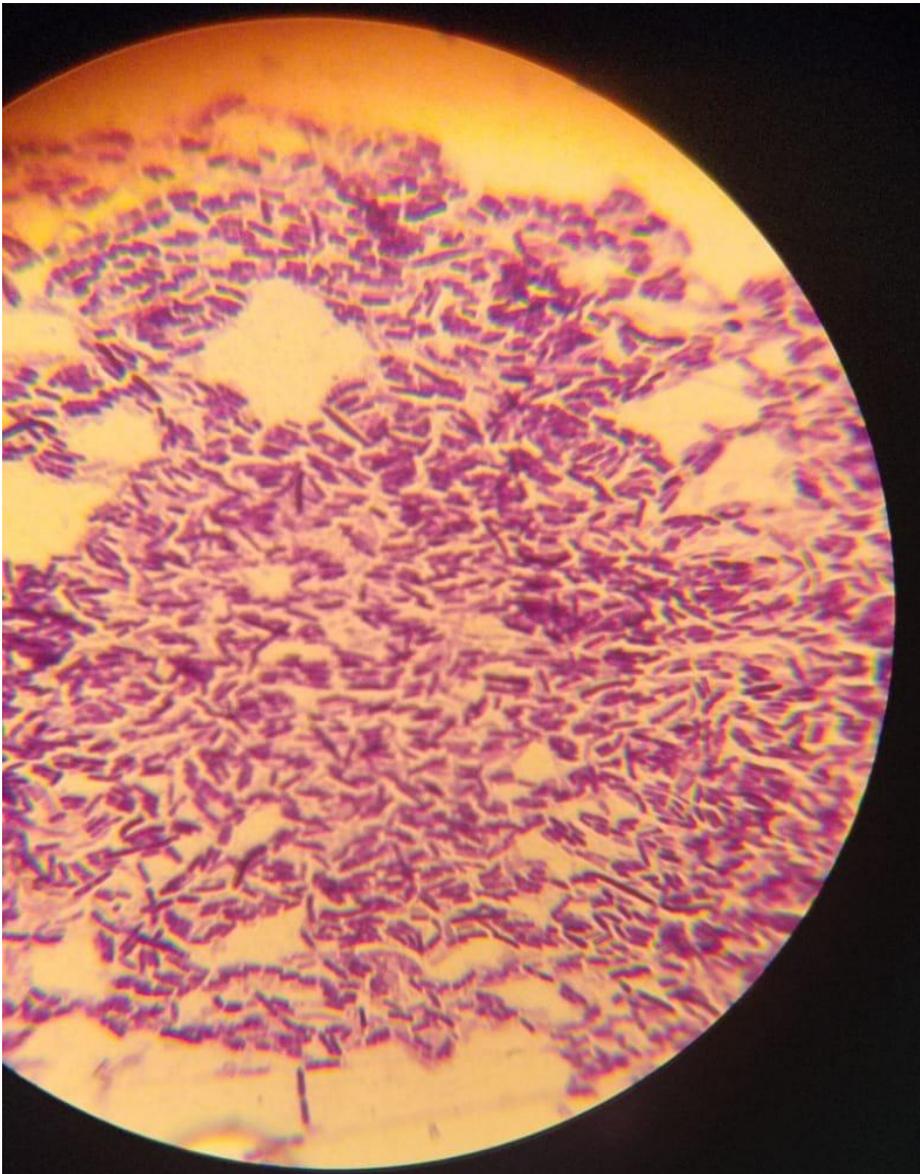
Fotografia 53 - Bacilos gram positivos observados em colônias obtidas nas amostras do ponto 8. Observa-se a presença de cápsula em torno de alguns dos bacilos.



Fotografia 54 - Bacilos gram positivos observados em colônias obtidas na amostra do ponto 4. Observa-se a presença de grânulos de reserva nas extremidades dos bacilos, sugestivo de corinebacteria, bactéria encontrada no solo.



Fotografia 55 - Bacilos Gram positivos observados em colônias obtidas do ponto 15. São visíveis bacilos com cápsula.

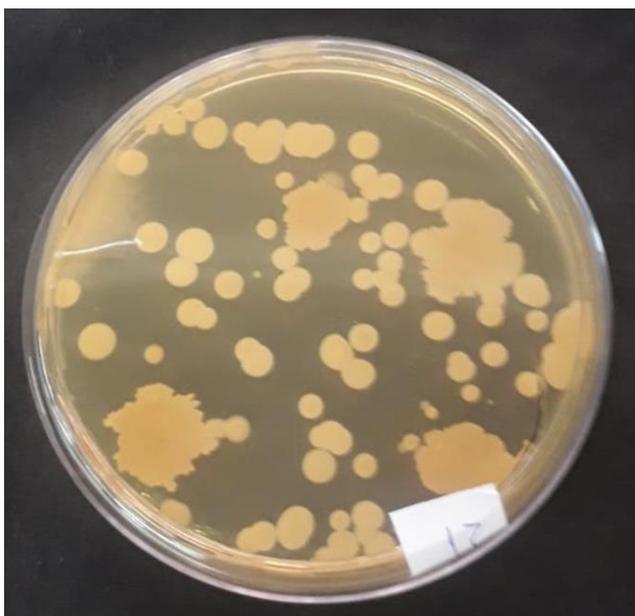


Algumas das bactérias predominantes do solo são as dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*. Quanto aos fungos, predominam, entre outros, *Penicillium* e *Aspergillus*. Nas fotografias 56 e 57 são observadas placas contendo colônias sugestivas de alguns desses microrganismos.

Fotografia 56 – Colônias sugestivas de *Bacillus* e de *Penicillium*.



Fotografia 57 – Colônias sugestivas de *Bacillus*.



## PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA PRESENTE NO SOLO E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### Determinação do pH e da temperatura das amostras de água.

O pH e a temperatura das amostras de água são apresentados na tabela 6.

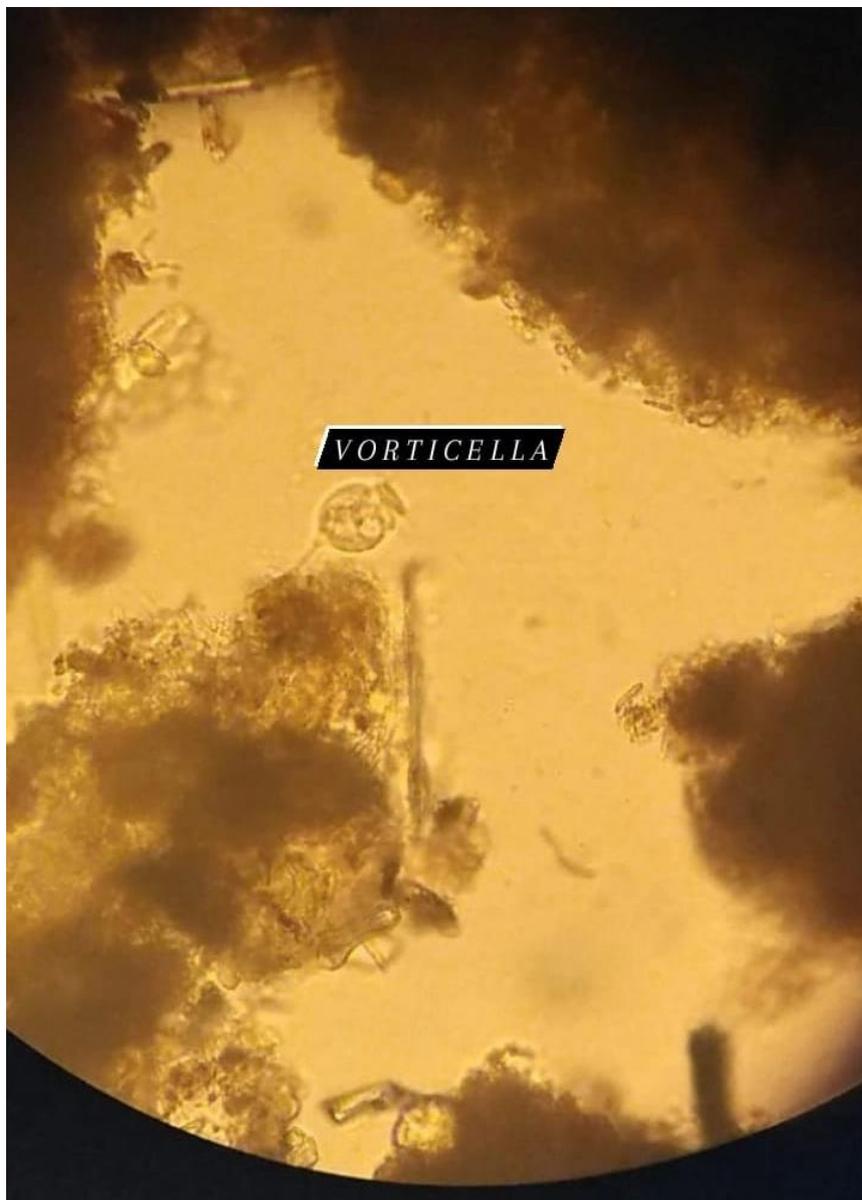
Tabela 6 – pH e temperatura das amostras de água

Ponto	pH	Temperatura (°C)
2	7,90	22,4
4	6,08	23,2
6	7,02	22,0
9	7,23	21,8
11	6,48	22,1
12	6,18	21,9
13	6,24	22,4
14	6,84	22,0
17	5,81	22,8
18	3,46	22,3
19	6,29	22,6

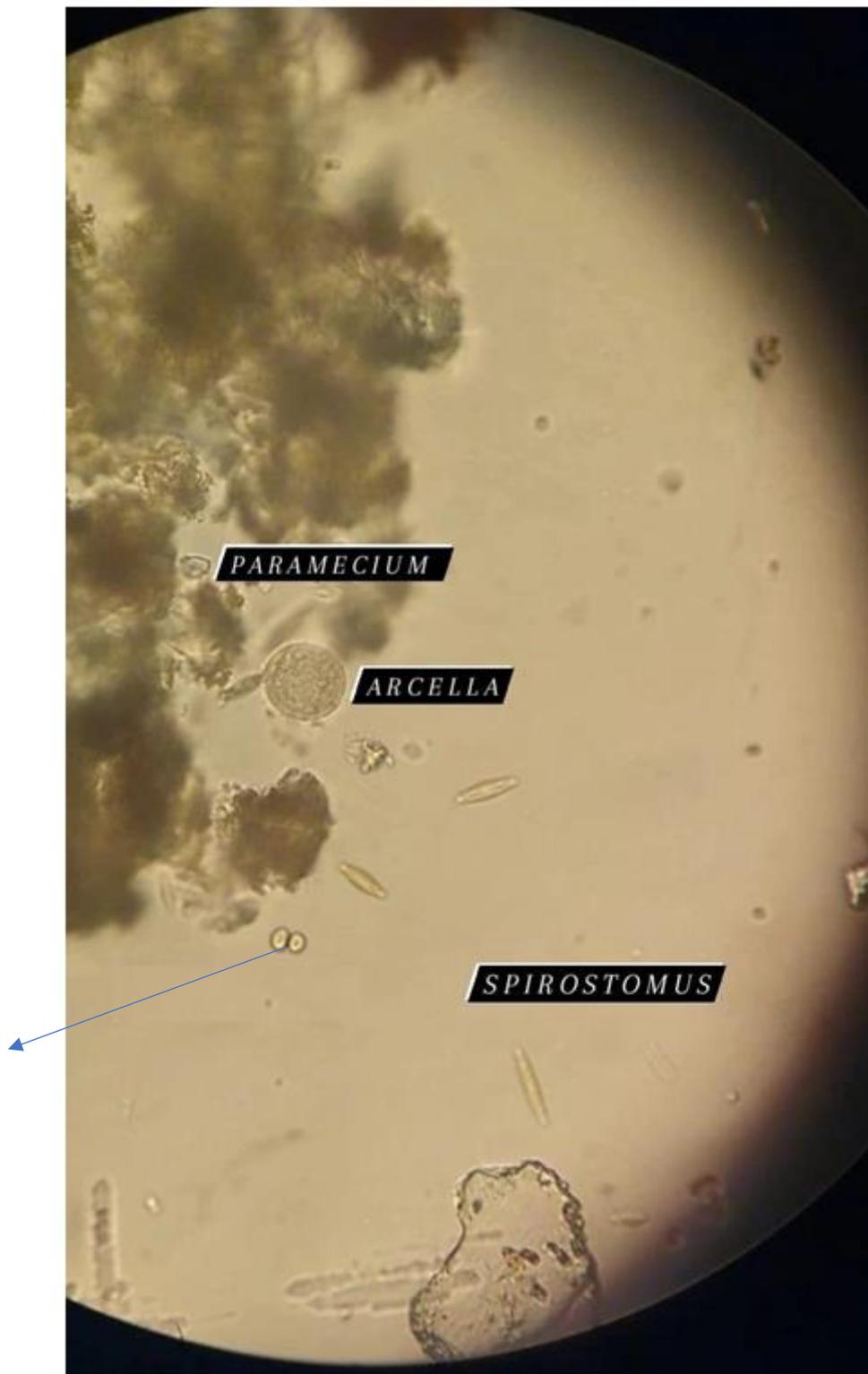
### Estudo do plâncton nas amostras de água

Para o estudo do plâncton presente nas amostras de água, foi feito o exame a fresco: uma gota da amostra foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com lamínula de vidro e observada ao microscópio (ampliação 100 X e 400X). As fotografias 58 a 64 apresentam o plâncton observado.

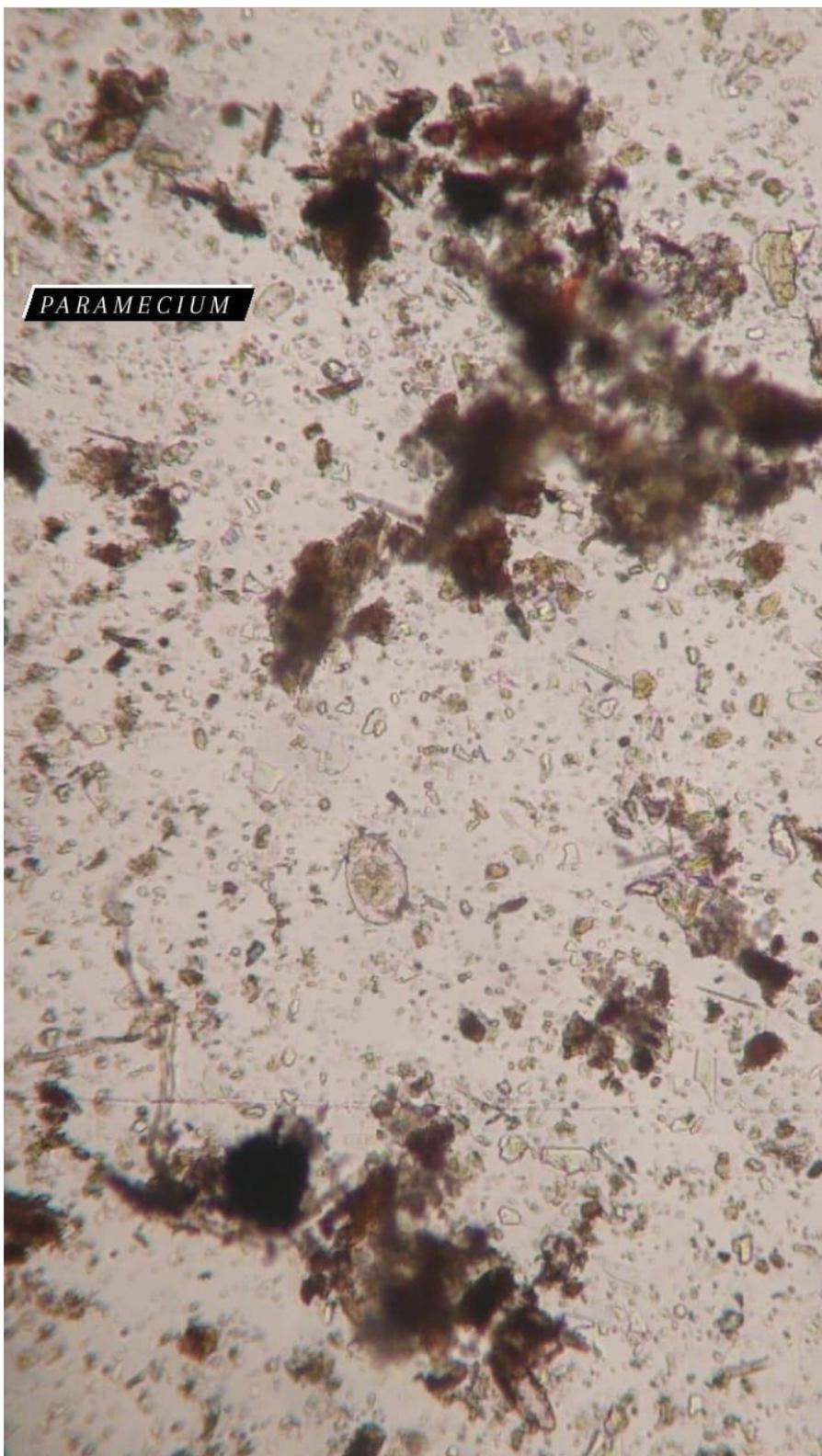
Fotografia 58 – Observação de protozoário ciliado (*Vorticella*).



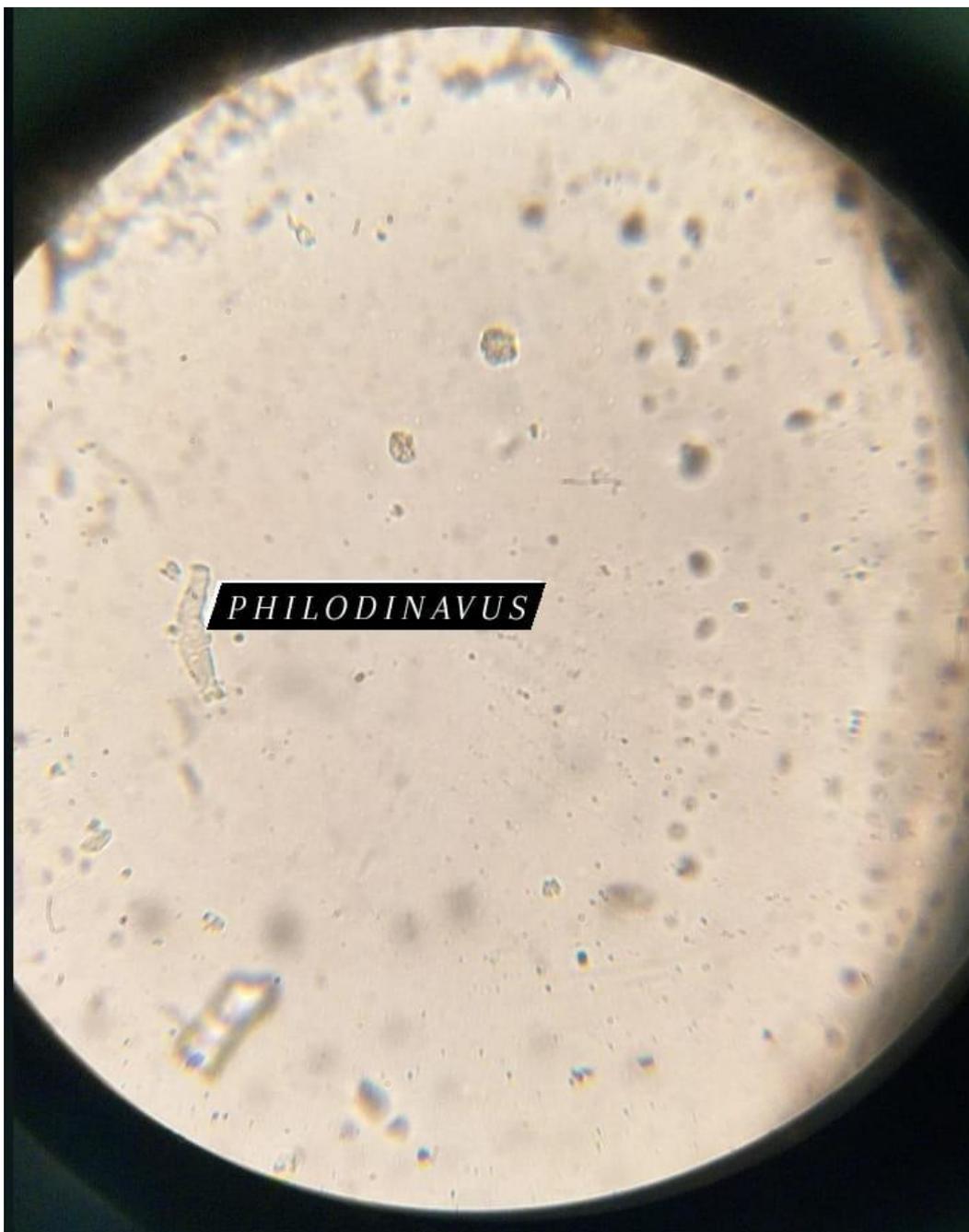
Fotografia 59 – Observação de protozoários ciliados (*Paramecium* e *Spirostomum*) e protozoário do grupo das amebas (*Amoeba*). Também são visíveis exemplares do fitoplâncton (seta)



Fotografia 61 – Observação de protozoários ciliados.



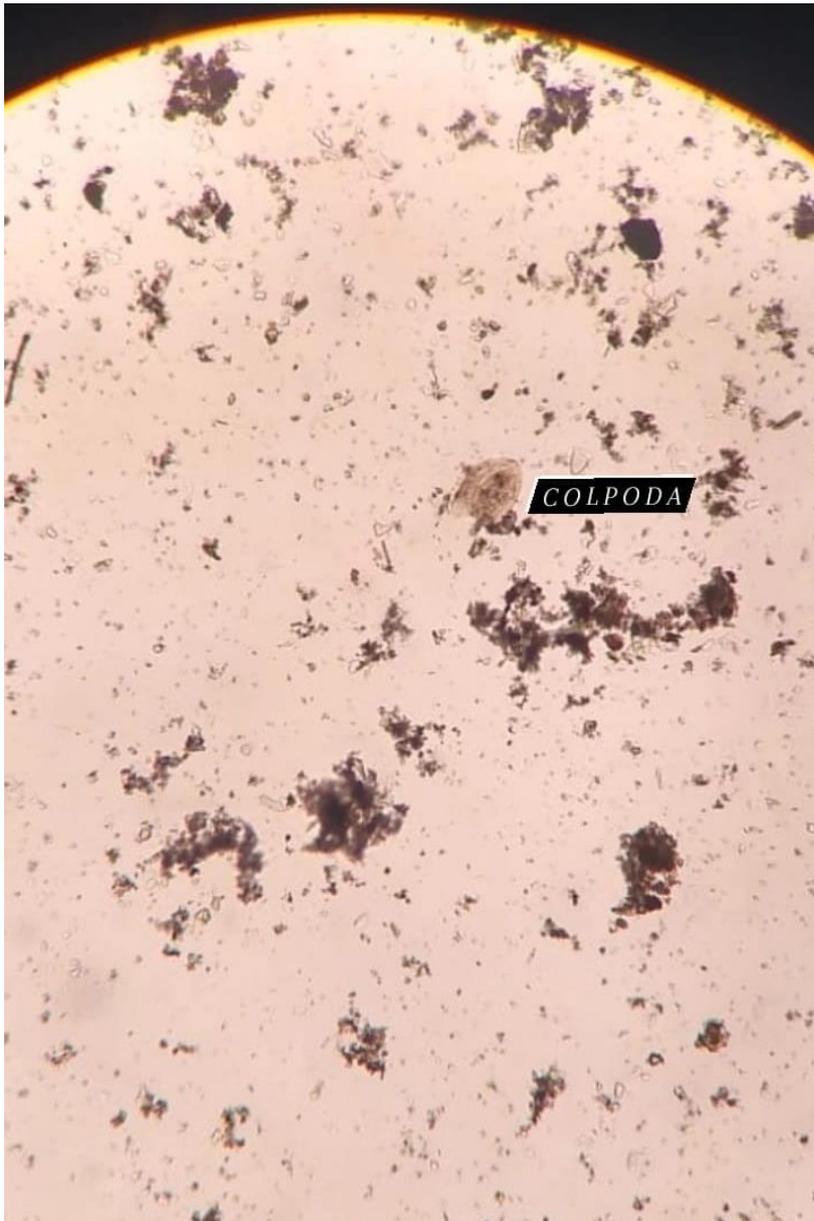
Fotografia 62 – Observação de um rotífero (metazoário).



Fotografia 63 – Observação de protozoário ciliado (*Paramecium*) e de um anelídeo (*Chaetogaster* – Metazoário).



Fotografia 64 – Observação de protozoário ciliado.



### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram coletados materiais para análises microbiológicas em 15 pontos distintos do solo do local de estudo. Para cada ponto, os materiais coletados foram inoculados em meios de culturas específicos para bactérias e fungos. Após o crescimento nestes meios de cultura, aproximadamente 3 lâminas foram feitas, com o material crescido, para observação ao microscópio óptico. A coloração e observação de microrganismos em lâminas ao microscópio, juntamente com o formato de crescimento das colônias nos

meios de cultura, auxiliam na identificação de alguns tipos de bactérias e fungos. Porém, para sabermos exatamente qual a classificação taxonômica de espécies, seriam necessárias algumas identificações ao nível molecular, bioquímico e ou genético, testes esses não realizados por ora.

Assim, com os testes que foram realizados para este projeto, nos limitamos à identificação de morfologia e coloração preliminar destes microrganismos. No que diz respeito às bactérias, em sua maioria se apresentou em forma de bacilos Gram positivos, microrganismos comumente encontrados em solo, e de importância ambiental. Os fungos encontrados também são de presença constante em ambientes úmidos e com vegetação nativa.

Também foram observadas ao microscópio, à fresco, ou seja, sem coloração, as amostras de água coletadas no local, verificando-se a presença de protozoários e outros componentes da microfauna associada, passíveis de serem identificados desta maneira. Os que foram encontrados são comumente de vida livre, ou seja, estão vivendo em seu habitat natural.

Não foram evidenciados, novamente com base nos testes aqui realizados, microrganismos patogênicos, que poderiam ser provenientes de uma contaminação e que poderiam causar algum dano à saúde. Inclusive ao coletar as amostras não se observou, macroscopicamente nenhum tipo de contaminação por lixo, ou por efluentes, ou por dejetos, sendo este um excelente sinal.

Lembrar que o ambiente é mutável, e que as análises aqui realizadas representam uma característica do tempo e espaço do estudo. O importante é a preservação do ambiente, para que este seja sustentável em si, e que as espécies vegetais, fauna e microrganismos se correlacionem com os fatores abióticos com local, formando uma comunidade harmônica, situação esta observada no local de estudo.