ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO E FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO

Fernanda Wiegand Mayer (PIBIC), Carolina Weigert Galvão (Orientador), e-mail: carolinawgalvao@hotmail.com
.
Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEBIOGEM

Ciências Biológicas/Bioquímica dos microrganismos

Palavras-chave: biorremediadores, bactérias diazotróficas, petróleo.

Resumo

O vazamento de petróleo que ocorreu em 16 de julho de 2000 na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR) foi responsável pelo derramamento de cerca de 4 milhões de litros de petróleo, causando grande impacto ambiental na flora e fauna locais. Uma das possíveis formas de recuperação a área impactada é a biorremediação. A biorremediação é o processo que utiliza microrganismos capazes de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo (HP) (SHARMA,2012). Outros microrganismos que também podem auxiliar no reestabelecimento vegetal de uma região são as bactérias diazotróficas. As bactérias diazotróficas são microrganismos capazes de contribuir com o crescimento vegetal por meio da fixação biológica do nitrogênio (MOREIRA, et. al, 2010). O presente trabalho buscou crescer bactérias diazotróficas do solo contaminado em meio NFB e fazer posterior contagem utilizando o método do número mais provável (NMP) descrito por Döbereiner, Baldani e Baldani (1995).

Introdução

A crescente demanda por Petróleo e seus derivados pelas atividades industriais e cotidianas aumentou os desastres ambientais envolvendo refinarias de petróleo, como o ocorrido em 16 de julho de 2000, onde quatro milhões de litros de óleo vazaram com o rompimento de uma tubulação de transporte da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), em Araucária, Paraná. Segundo a REPAR, apenas cerca de 350 mil não foram recolhidos, percolando pela drenagem dos terrenos adjacentes. Silva (2014), através de levantamentos florísticos e fitossociológicos, analisou a cobertura vegetal da várzea afetada 12 anos após o acidente, constatando que, mesmo com a presença de Hidrocarbonetos de Petróleo ainda vigente no solo, a cobertura vegetal foi completamente recuperada, entretanto, é escassa na literatura a correlação dos microrganismos biorremediadores com a recuperação da cobertura vegetal. Além disso, não há registro na literatura de bactérias fixadoras de nitrogênio com potencial para degradação de petróleo. Portanto, considerando que o ambiente contaminado com petróleo apresentou uma boa recuperação da sua cobertura vegetal e que o nitrogênio é um dos principais macronutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas, o presente estudo visou o isolamento das bactérias diazotróficas presentes no solo contaminado com petróleo da REPAR pelo método do número mais provável (NMP) como descrito em Döbereiner, Baldani e Baldani (1995).

Materiais e Métodos

A coleta do solo foi realizada no dia 23 de maio de 2018 na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR) em Araucária. Foram escolhidos 12 pontos estratégicos demonstrados na dissertação de Silva (2014), de acordo com a concentração de hidrocarbonetos e grupamento florístico, tendo o objetivo de fazer um paralelo com os estudos já realizados na área. Os pontos estão adjacentes a um sistema de manilhas instalado inicialmente na tentativa de alagar a várzea e remover parte dos contaminantes. Cada amostra composta de solo, de aproximadamente 500g, foi formada de 3 subamostras de solo equidistante de 1m da manilha, a primeira a 3m da manilha, a segunda a 7m da manilha e a terceira (raiz) da rizosfera de *Mimosa oblonga* ou *Erythrina crista-galli* L. (Corticeira do banhado) presentes no raio entre essas subamostras. As amostras foram coletadas com auxílio de um trado a 10cm de profundidade, posteriormente acondicionadas em sacos plásticos e colocados em um isopor com gelo para o transporte, sendo mantidos em geladeira para posteriores experimentos no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana, UEPG.
O método empregado nas análises foi o do número mais provável (NMP), onde pesa-se 10 gramas de solo rizosférico (para cada ponto analisado), em seguida as amostras são transferidas, separadamente, para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) e mantidas sob agitação orbital (80 rpm) por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a agitação, 0,1mL da solução de solo foi submetida a uma diluição seriada (10^{-2} a 10^{-5}) em solução salina. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas em triplicata em frascos contendo 3 mL do meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio (NFB), (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999) para contagem de diazótrofos pelo método do número mais provável (NMP) como descrito em Döbereiner, Baldani e Baldani (1995). A partir do dia de inoculação, os frasquinhos foram encubados em estufa a 30ºC por 7 dias, sendo verificada a formação de película diariamente. Os frasquinhos que apresentaram crescimento de película foram selecionados para contagem do número mais provável (NMP).

Revisão de literatura

Alguns microrganismos que podem ser utilizados na recuperação de uma área afetada são as bactérias diazotróficas, microrganismos capazes de contribuir com o crescimento vegetal por meio do fornecimento principalmente de nitrogênio e outros compostos (MOREIRA, et. Al.,2010). Oliveira (2013), após extensa revisão bibliográfica, constatou que, alguns dos principais gêneros envolvidos na degradação de hidrocarbonetos de petróleo (HP), são: *Pseudomonas, Beijerinckia, Gordonia, Flavobacterium, Nocardia, Mycobacterium, Burkholderia, Microbacterium, Spirillum, Bacillus,* entre outros. Dentre elas, alguns gêneros podem ser classificados como bactérias diazotróficas, como: *Pseudomonas, Beijerinckia, Burkholderia, Spirillum* e *Bacillus (*MOREIRA, et.al., 2010), sendo possível observar, portanto, que vários gêneros de bactérias diazotróficas podem estar associadas à degradação de hidrocarbonetos de petróleo (HP).

Resultados e Discussão

Para análise do NMP segundo a concentração de hidrocarbonetos, os doze pontos amostrais foram agrupados em concentração máxima, média, e mínima de hidrocarbonetos por grama de solo, bem como foi realizado o índice de similaridade de Jaccard, agrupando as espécies encontradas nas várzeas em três grupos (Fig. 1).

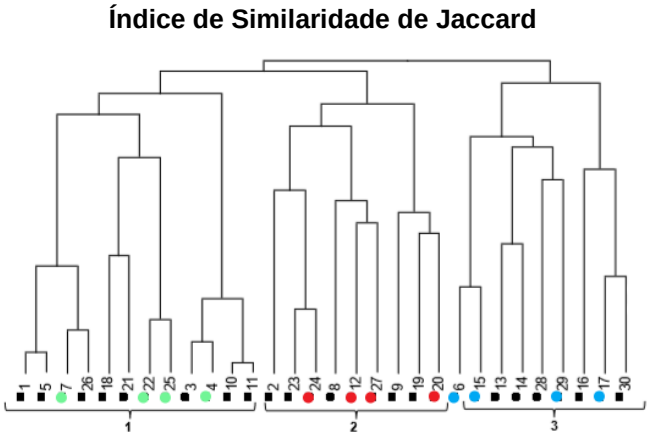


Fig. 1: Dendrograma do Índice de Similaridade de Jaccard entre os pontos amostrais da várzea da REPAR, Araucária, PR. Em colorido os pontos escolhidos para o presente trabalho (Fonte: Adaptado de SILVA, 2014).

Os resultados mostram uma grande variação no número de diazotrofos para as amostras coletadas nos pontos com baixa, média e alta concentração de hidrocarbonetos (Fig. 2A). Já as análises feitas seguindo os grupos florísticos demostram maior homogeneidade, sendo o Grupo 3 foi o que apresentou maiores números de bactérias fixadoras de nitrogênio e também a maior média. Já o Grupo 2 obteve a segunda melhor média, seguida do Grupo 1(Fig 2B).
O desvio padrão nos três grupos foi relativamente baixo, mostrando maior homogeneidade entre os grupos florísticos do que entre o agrupamento segundo a concentração de hidrocarbonetos.

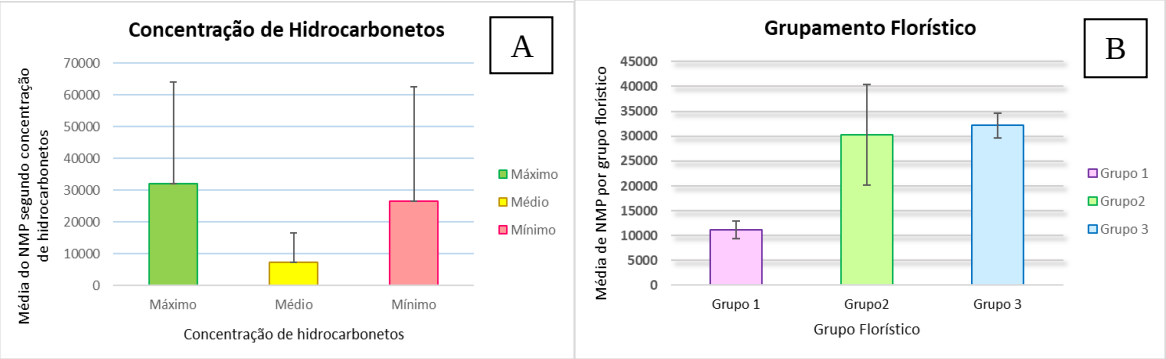


Fig 2: A) Média e desvio padrão dos 12 pontos amostrais agrupados segundo a concentração de hidrocarbonetos. B) Média e desvio padrão dos 12 pontos amostrais agrupados segundo o grupamento florístico.

Conclusões

O resultado se mostrou diferente do esperado, pois os pontos onde havia uma concentração mínima de hidrocarbonetos, seria esperado que apresentasse maior crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, (considerando que em relações

ecológicas, menores concentrações de hidrocarbonetos de petróleo causariam menos estresse nas plantas e nos microrganismos locais), o que não ocorreu, os pontos com máxima concentração de petróleo foram os que apresentaram maior número de bactérias fixadoras de nitrogênio. O desvio padrão mostra que tanto para os pontos mínimos quanto para os pontos médios, os valores do NMP estão dispersos ao redor da média, enquanto apenas para os pontos máximos esses valores tornam-se homogêneos. Já de acordo com os grupos florísticos, devido ao baixo desvio padrão e maior homogeneidade, é possível concluir que para comunidades microbianas rizosféricas, a capacidade de sobrevivência é fortemente influenciada pela resiliência da planta a condições de estresse.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq, pela disponibilização da bolsa e apoio a pesquisa, a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM), especialmente aos professores pela orientação do projeto e aos acadêmicos de graduação e pós-graduação pela ajuda e ensinamento. Agradeço também à Petrobras, pelo financiamento da pesquisa e por todo o aporte necessário.

Referências

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D**. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 30**. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 12 de novembro de 2010.

MOREIRA, S. F. Fatima & et. Al. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações**. Comunicata Scientiae 1(2): 74-99, 2010.

OLIVEIRA, R. M. **Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados**. 2013. 16f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Belo Horizonte, 2013.

PINHATI, F. R. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Quim. Nova**, v. 37, n 8, p.1269-1274, 2014.

SHARMA, Shilpi. **Biorremediation: Features, Strategies and Applications**. Asian Journal of Pharmacy and Life Science, Vol. 2 (2), April-June,2012.

SILVA, M. Y. B. da. **Florística e estrutura de uma Formação Pioneira com Influência Flúvio-lacustre 12 Anos após derramamento de óleo, Araucária, Paraná**. 2014. 131f. Tese (Programa de Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2014.

VIDALI, M. **Biorremediation. An overview**. Pure Appl. Chem., Vol. 73, No. 7, pp. 1163–1172, 2001.

VIDEIRA, S. Sandy & et. al. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia – Rio de Janeiro,agosto/2007.