ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA BIORREMEDIÇÃO DE PETRÓLEO

Érica Nascimento (PIBIC), Rafael Mazer Etto, Daiane de Fátima Barreto, Christopher Thomas Blum, Carlos Vellozo Roderjan, Carolina Weigert Galvão (Orientador), e-mail: erica31nascimento@gmail.com, e-mail do orientador: carolinawgalvao@hotmail.com;

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Bioquímica, bioquímica dos microrganismos.

Palavras-chave: biorremediação, ecologia microbiana, degradação de hidrocarbonetos.

Resumo

Em 16 de julho de 2000, quatro milhões de litros de óleo vazaram com o rompimento de uma tubulação da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), unidade da Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras), em Araucária-PR, vazamento que atingiu solos, águas e comunidades bióticas próximas do oleoduto. O petróleo é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos e em menores quantidades, por compostos não hidrocarbônicos e outros componentes, estando presentes os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) que são compostos tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos. O solo é o local de uma vasta diversidade microbiana, sendo as bactérias responsáveis pelos principais ciclos biogeoquímicos. Desta forma as bactérias têm um papel importante na biorremediação de ambientes contaminados por petróleo. O presente trabalho obteve 160 isolados do solo contaminado da REPAR que apresentam potencial para biorremediação.

Introdução

Em 16 de julho de 2000, quatro milhões de litros de óleo vazaram com o rompimento de uma tubulação da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), unidade da Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras), em Araucária-PR, atingindo alguns dos poucos fragmentos de Floresta Ombrófila Mista Aluvial (floresta aluvial) remanescentes na região e uma expressiva área de Formação Pioneira Flúvio-lacustre (várzea). O óleo derramado atingiu os solos, as águas e as comunidades bióticas próximas à conexão do oleoduto com o complexo da refinaria onde ocorreu o vazamento (SILVA, 2014).

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos e em menores quantidades, por compostos não hidrocarbônicos e outros componentes orgânicos, alguns constituintes organometálicos, especialmente complexos de vanádio e níquel. Em sua composição estão presentes os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) que são compostos tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos (WIDDEL; RABUS, 2001; FOGHT, 2008).

O estudo da diversidade microbiana presente no solo é essencial para a descoberta de espécies que sejam capazes de degradar os componentes do petróleo já que os métodos tradicionais de remediação causam impactos ao

ambiente com a introdução de agentes químicos, possuem altos custos e muitas vezes não se mostram efetivos na remediação dos poluentes (DELLAGNEZZE et al, 2014; WU et al, 2017).

Uma alternativa para a recuperação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos, é a biorremediação, que consiste em tornar esses compostos inertes ou potencialmente menos tóxicos ao ambiente, cujo princípio consiste na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de microrganismos presentes ou adicionados no local da contaminação (BERNOTH et al., 2000).

Desde o último século, bactérias aeróbicas e anaeróbicas têm demonstrado grande potencial para a remediação de poluentes do petróleo, reduzindo o nível de contaminação do solo, como por exemplo os gêneros *Acidovorans, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Aeromonas, Arthrobacter, Beijemickia, Burkholderia, Bacillus, Comomonas, Corynebacterium, Cycloclasticus, Flavobacterium, Gordonia, Microbacterium, Moraxella, Mycobacterium, Micrococcus, Neptunomonas, Nocardia, Paracoccus, Pasteurella, Polaromonas, Pseudomonas, Ralstonia, Rhodococcus, Sphingomonas, Stenotrophomonas, Streptomyces e Vibrio* (CRAPEZ et al. 2002, JACQUES et al. 2007, MANDRI & LIN 2007). O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias com potencial para degradar petróleo do solo afetado pelo derramamento de petróleo da REPAR.

Materiais e Métodos

Doze amostras de 500g de solo, de 10 cm de profundidade, foram coletadas na Refinaria Presidente Getúlio Vargas em Araucária (REPAR) – PR, em uma área de várzea de 5,5 hectares que apresenta valores de hidrocarbonetos totais de petróleo variando de 200 a 6.400 mg/kg de solo. De cada amostra foram pesados 10 g de solo e transferidas 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 a 27ºC. Após a agitação, 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 placas contendo 20 mL do meio de cultura BH (BUSHHNELL; HAAS, 1941) para crescimento microbiano acrescido de petróleo. Após sete dias de crescimento em uma estufa a 27ºC, as colônias encontradas foram transferidas para uma placa maior também contendo meio BH acrescido de petróleo, onde passaram mais sete dias de crescimento a 27ºC em estufa. Por sua vez, as colônias que se mantiveram em crescimento foram inoculadas em placas contendo meio de cultura M9 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) sólido e esperou-se o crescimento por cinco dias nas mesmas condições dos isolamentos anteriores. Após o tempo estimado as colônias encontradas nas placas foram inoculadas em frascos de 10 mL contendo meio de cultura M9 líquido e estocadas em glicerol.

Resultados e Discussão

Foram isoladas 160 bactérias de 12 pontos distintos, sendo 46 para o gradiente de petróleo de 200 a 1500 mg/kg (mínimo), 63 para o gradiente de petróleo de 1500 a 3000 mg/kg (médio) e 51 para o gradiente de petróleo de 3000 a 6400 mg/kg (máximo) como mostra a tabela 01. O isolamento de bactérias degradadoras de petróleo vem ocorrendo desde a década de 1950, desde então muitos gêneros já foram descritos na literatura. Zhang e colaboradores (2010) isolaram 38 bactérias provenientes de um solo contaminado com óleo. Sun e

colaboradores (2018) isolaram 595 bactérias, destas 244 apresentaram crescimento em meios de cultura contendo hexadecano como única fonte de carbono e 27 isolados foram capazes de degradar fenóis.

Tabela 01 – Isolamento de bactérias presentes em solo de várzea contaminado com petróleo.

Ponto de coleta	Gradiente de hidrocarbonetos (mg/kg)	Isolados amostra A	Isolados amostra B
12	644,95	12	9
15	439,00	3	6
22	183,84	4	1
29	372,80	4	7
4	1.983,60	0	4
17	761,59	9	8
25	1.352,86	11	9
27	1.284,02	12	10
6	2.696,66	4	2
7	3.528,90	10	3
20	6.444,62	12	7
24	3.534,46	8	5
Total		89	71

Conclusões

O solo da REPAR apresenta bactérias com potencial para degradação do petróleo. Após uma profunda caracterização bioquímica e molecular será possível avaliar quais grupos de hidrocarbonetos essas bactérias conseguem degradar. Ainda estão previstos mais testes com esses isolados bacterianos, como sequenciamento do gene ribossomal 16S, ensaio de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol e testes com sideróforos e ácido indolacético para selecionar mais especificamente quais tem o melhor potencial para biorremediação deste solo.

Agradecimentos

Ao CNPq, Fundação Araucária, Capes, Petrobrás. À equipe do LABMOM da UEPG e à equipe do Laboratório de Dendrologia/Herbário Florestal da UFPR.

Referências

BERNOTH, L. et al. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Minerals and Metallurgical Processing (USA)**, v. 17, n. 2, p. 105-111, 2000.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653, 1941.

CRAPEZ, M. A. C. et al. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, p. 32-37, 2002.

DELLAGNEZZE, B. M. et al. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, n. 1-2, p. 191-200, 2014.

FOGHT, J. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 2-3, p. 93-120, 2008.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural, Santa Maria**. Vol. 37, n. 4 (jul. /ago. 2007), p. 1192-1201, 2007.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 25-27, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press, 2001.

SILVA, M. Y. B. **Florística e Estrutura de Uma Formação Pioneira com Influência Flúvio-lacustre 12 Anos Após Derramamento de Óleo, Araucária, Paraná**. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SUN, J. et al. Functional genetic diversity and culturability of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

WIDDEL, F; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 259-276, 2001.

WU, M. et al. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. **Chemosphere**, v. 169, p. 124-130, 2017.

ZHANG, Z. et al. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8452-8456, 2010.