



Isolamento de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos provenientes de solos contaminados, de solos florestais e de resíduos da indústria vinícola

Marcia Rodrigues Sandri¹, Luana Carolina Alves Feitosa¹, Anderson Soares Pires¹, Giovani André Piva¹

¹Purus Soluções Ambientais LTDA. (marcia@purus.com.br)

Resumo

Contaminações ambientais com petróleo e seus derivados são extremamente danosas aos ecossistemas, necessitando na maioria das vezes de uma intervenção que permita acelerar o processo de descontaminação. Dentre os métodos possíveis de serem utilizados para este fim, a biorremediação se apresenta como uma alternativa menos custosa e menos agressiva para o ambiente, pois normalmente não gera passivos ambientais. Neste contexto se justifica a busca por uma tecnologia que utilize micro-organismos capazes de degradar contaminantes como o óleo diesel, composto tão comum em acidentes ambientais. Solos contaminados com óleo diesel foram utilizados para o isolamento de bactérias. Além disso, foram fabricadas iscas contendo óleo diesel que foram expostas na natureza a fim de coletar micro-organismos que fossem capazes de degradar este composto. No total foram isoladas 45 bactérias, das quais seis apresentaram atividade positiva de degradação, verificada pela mudança de coloração utilizando o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio como indicador em meio mineral contendo apenas óleo diesel como fonte de carbono. O isolamento de micro-organismos do solo pelo método de enriquecimento foi mais eficiente em selecionar bactérias degradadoras de óleo do que o uso de iscas implantadas no ambiente.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos, Biorremediação, Micro-organismos.

Área Temática: Tema 6 – Tecnologias Ambientais

Abstract

Environmental contamination with petroleum and its products are extremely harmful to ecosystems, most often requiring an intervention in order to accelerate the decontamination process. Among the possible methods to be used for this purpose, bioremediation is considered as a less expensive and less aggressive to the environment as it usually does not generate environmental liabilities. In this context we are searching for a technology that applies microorganisms capable of degrading contaminants such as diesel, which are so common in environmental accidents. Diesel contaminated soils were used for isolation of bacteria in this study. Furthermore, were exposed in nature a particular type of bait, created using diesel oil, in order to discover microorganisms able to degrading this compound. There were isolated 45 bacterial strains. Six of them presented positive degradation activity, observed for the color change in mineral medium containing only diesel as a carbon source and the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as indicator. Microorganisms isolation from the soil using the enrichment method was more efficient to select degrading bacteria than the baits methodology.

Key words: Hydrocarbons, Bioremediation, Microorganisms.

Theme Area: Theme 6 – Environmental Technologies



1 Introdução

O petróleo é um insumo indispensável na fabricação de diversos produtos utilizados em nossa sociedade como combustíveis, plásticos, tintas, fertilizantes, resinas, entre outros. O petróleo é composto principalmente de hidrocarbonetos, e entre eles estão compostos bastante tóxicos e potencialmente carcinogênicos como benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos e naftaleno. Portanto, a sua exploração assim como as atividades de refino, armazenamento e transporte são de grande risco ambiental, pois este óleo pode contaminar os ambientes, tanto aquáticos como terrestres, causando mortes, infertilidade ou outros danos aos organismos e o consequente desequilíbrio dos ecossistemas (BARATHI e VASUDEVAN, 2001; SARKAR et al., 2005; ZHANG et al., 2004).

Apesar de todo o cuidado e fiscalização sobre as atividades que envolvem o petróleo e seus derivados, acidentes e vazamentos são bastante comuns. Somente no mês de janeiro deste ano, ocorreram dois vazamentos importantes de petróleo em atividades marítimas, localizados na Bacia de Santos (SP) e em Tramandaí (RS). Ocorreram também diversos acidentes em terra, dois envolvendo descarrilamento de locomotivas onde houve vazamentos de óleo diesel, três acidentes envolvendo derramamento de biodiesel e mais sete acidentes onde foi detectado vazamento de óleo ou outros combustíveis (IBAMA, 2012).

Acidentes envolvendo derivados de petróleo ocorrem frequentemente em solos, decorrentes das atividades de armazenamento e transporte dos produtos. Dentre estes, o diesel, por ser bastante utilizado e por conter compostos mais recalcitrantes do que a gasolina é um produto que frequentemente necessita de intervenções nas áreas onde ocorrem vazamentos. Segundo técnico da FEPAM, no estado do Rio Grande do Sul (excetuando-se a capital Porto Alegre) existem 3129 postos de combustíveis cadastrados, dos quais 143 estão em avaliação ou quantificação do grau de contaminação, 217 estão com terrenos contaminados, necessitando de remediação e 151 já foram reabilitados ou estão em reabilitação da contaminação detectada (Dutra Filho, 2011).

Dependendo do nível de contaminação, da sua potencial mobilidade e do risco que ela representa para as comunidades e os ecossistemas, deve ser avaliado se o local pode permanecer como está e assim será esperada uma atenuação natural, ou se deve ser realizada uma intervenção. A atenuação natural acontece em decorrência de processos naturais como biodegradação ou biotransformação dos contaminantes; adsorção dos contaminantes a matrizes ou compostos minerais, tornando-os indisponíveis para a biota e perda da toxicidade por volatilização ou diluição. Na maioria dos casos a atenuação natural é um processo bastante lento e então intervenções humanas são necessárias (ALVAREZ e ILLMAN, 2006).

As opções mais freqüentemente utilizadas na limpeza de ambientes costeiros contaminados por hidrocarbonetos incluem uso de materiais absorventes, bombeamento a vácuo, utilização de “skimmers” para remoção do óleo, jateamentos com água ou areia e utilização de produtos dispersantes (CANTAGALLO, 2007). Já para acidentes ocorridos em solos, sedimentos ou lodos são recomendadas tecnologias como bioventilação, extração de vapores, *air sparging*, incineração, dessorção térmica, disposição em biopilhas, *landfarming*, biorremediação *in situ* e introdução de oxidantes químicos (PEDROZO, 2002).

Uma boa alternativa na descontaminação dos ambientes e também de resíduos gerados nas indústrias é a biorremediação. Em geral é uma técnica menos onerosa, pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*, não necessita a utilização de grandes equipamentos, provoca pouca perturbação nas atividades locais e na maioria das vezes não produz resíduos que necessitem de disposição (CRAWFORD, 2006; PEDROZO, 2002).

A biorremediação se caracteriza pelo emprego de organismos vivos, mais freqüentemente micro-organismos ou plantas, ou ambos, ou produtos originados de organismos vivos (enzimas, biosurfactantes) para detoxificar, ou seqüestrar químicos tóxicos presentes em ambientes aquáticos ou solos (CRAWFORD, 2006). A biodegradação realizada



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

por alguns micro-organismos consiste na quebra química das moléculas de hidrocarbonetos por ação de enzimas específicas. Eles podem utilizar o hidrocarboneto como fonte de carbono para geração de energia e biomassa, caracterizando o catabolismo, ou então realizar uma degradação por co-metabolismo, que ocorre quando o composto é metabolizado na presença de uma outra fonte de carbono primária (BOOPATHY, 2000; GOLEV, 1978). Porém, no ambiente, os micro-organismos com esta capacidade podem estar em baixa quantidade, e então as técnicas de biorremediação atuam no sentido de aumentar a população e a atividade destes microrganismos, caracterizando a bioestimulação, ou também adicionando micro-organismos, o que se denomina bioaumento. A bioestimulação pode ser realizada adicionando-se nutrientes e/ou oxigênio, e controlando-se condições como temperatura umidade e pH do ambiente a ser descontaminado (CRAWFORD, 2006). O bioaumento é realizado a partir de micro-organismos que podem ser provenientes do local ou não, multiplicados em biorreatores e posteriormente inoculados (RISER-ROBERTS, 1998).

Bento (2005) descreve que um consórcio de bactérias isolado de um solo contaminado foi mais eficiente no tratamento deste mesmo solo do que de outros solos contaminados, porém existe uma extensa literatura científica que relata isolamento de micro-organismos degradadores provenientes de solos contaminados, aplicando-os nos mais diversos substratos. As bactérias mais isoladas para degradação de hidrocarbonetos incluem principalmente espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, mas também são citados outros gêneros como *Microbacterium*, *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* e *Nocardia* (LEAHY e COLWELL, 1990; ZHANG, 2004; JAQUES, 2005; RICHARD e VOGEL, 1999).

Além de aplicações na descontaminação de ambientes atingidos por acidentes envolvendo vazamentos de petróleo ou derivados, a biorremediação pode ser utilizada para tratamento de resíduos gerados pelas diversas indústrias da cadeia produtiva do petróleo. Efluentes líquidos ou sólidos biodegradáveis que contenham hidrocarbonetos podem também ser tratados por biorremediação.

O objetivo deste trabalho é selecionar micro-organismos capazes de degradar o óleo diesel para posteriores aplicações em tratamentos de biorremediação por bioaumento de solos contaminados, em bioplílias ou biorreatores.

2 Materiais e Métodos

O isolamento de micro-organismos foi realizado a partir de quatro amostras de solos contaminados com diesel e também de cinco “iscas” contaminadas com diesel expostas a ambientes diversos por 30 dias.

Os solos contaminados foram analisados de duas maneiras: diretamente e pelo método de enriquecimento. Para análise direta do solo, foram pesadas 10 g deste solo, diluído e homogeneizado em 90 mL de solução salina 0,9%. Foram feitas diluições seriadas e plaqueamentos pelo método de espalhamento com auxílio da alça de *Drigalsky* em Ágar Nutritivo (AN: peptona 5 g/L; extrato de carne 3 g/L; ágar 15 g/L). Após 48 h de incubação deste ágar a 30°C, as colônias diferentes e mais abundantes foram isoladas em AN por esgotamento, a fim de purificar e obter colônias isoladas. Depois de purificadas, estas colônias foram estocadas em tubos de ensaio com o mesmo ágar, e acondicionadas em refrigerador, para análises posteriores. Para a análise do solo por enriquecimento, 5g de solo foram adicionados a 50 mL de um meio de cultivo composto de sais minerais e diesel como única fonte de carbono (meio Bushnell-Hass: MgSO₄.7H₂O 0,2 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,02 g/L; KH₂PO₄ 1g/L; KHPO₄ 1 g/L, NH₄NO₃ 1 g/L; FeCl₃ 0,05g/L). Após autoclavagem foi adicionado 1% de diesel. Os erlenmeyers contendo estas amostras foram incubados em agitador orbital a 150 rpm e 30°C. Após 5 ou 7 dias de incubação foi retirada uma alíquota de



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

1 mL deste meio de cultura e transferida para um novo meio idêntico, que foi incubado por mais 5 ou 7 dias, e foi realizado este procedimento mais 2 vezes, tendo o enriquecimento durado cerca de 1 mês. O objetivo deste método é selecionar ao longo do tempo os micro-organismos que tenham a capacidade de degradar o óleo diesel, e diminuir a quantidade daqueles micro-organismos que estavam presentes no solo que não possuem esta habilidade. Ao final do período de enriquecimento, as amostras foram plaqueadas em AN e após incubação a 30°C por 48 h as colônias diferentes e mais abundantes foram isoladas e estocadas.

As iscas utilizadas para a captação de micro-organismos do ambiente capazes de degradar óleo diesel foram fabricadas da seguinte maneira: foi esterilizada em autoclave uma solução de água destilada que continha 20% (p/v) de serragem, 2% (p/v) de extrato de malte e 1% (v/v) do fertilizante líquido Beifort. Após autoclavagem foi adicionado 10% (v/v) de diesel. A esta solução foram adicionadas quatro partes de uma mistura contendo serragem e o produto Beifort S-10 na proporção de 1:1. Entorno de um litro desta mistura pronta foi envolta em sombrите para a fabricação das iscas, e estas foram dispostas sobre pratos plásticos, nos solos de diferentes locais em mata ou em pilhas de compostagem. Após 30 dias de exposição no ambiente, as iscas foram recolhidas para análise em laboratório. Uma alíquota de 10 g do material da isca foi diluída em 90 mL de solução salina 0,9% e foram realizadas diluições seriadas e plaqueamentos em AN. As placas foram incubadas por 48h a 30°C e após foram isoladas as colônias diferentes e mais abundantes, as quais foram estocadas conforme descrito anteriormente.

O teste para degradação de óleo diesel foi adaptado de Bento (2004). O isolado foi inoculado em meio Bushnell-Hass (BH) contendo Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio (TTC) solução de 0,025% na proporção de 1:4 com o meio BH), com 1% de diesel, em triplicata, e incubado a temperatura de 28°C por até 14 dias. O TTC é um composto que através de enzimas desidrogenases, recebe os íons de hidrogênio liberados pela respiração das células vivas, e é reduzido a formazan dentro das células, o qual possui coloração vermelha ou púrpura. Este composto é utilizado em diversas metodologias como testes de viabilidade de tecidos, sementes, utilizado em meios de cultura com interferentes, para quantificação de microrganismos do solo, entre outros usos (KUNZ, V.T., 2007; PERES, 2004; BASTOS, 2007). No método utilizado neste trabalho, a mudança de coloração do meio de transparente para rosa indica a atividade aeróbica do isolado, que estaria utilizando o diesel como fonte de energia primária para as atividades celulares, já que inexiste outra fonte de carbono no meio.

3 Resultados e Discussão

No total foram isoladas 45 bactérias dos solos e das iscas, das quais apenas 6 apresentaram o resultado positivo para o teste com óleo diesel e TTC. Dentre os 25 micro-organismos isolados de solo, 4 (16%) apresentaram turbidez e mudaram a coloração do meio líquido para rosa (Figura 1), indicando a utilização do óleo diesel como fonte de carbono para o crescimento.

Foi possível observar também que o método de enriquecimento foi mais eficiente em isolar micro-organismos degradadores do que o método direto, pois para o primeiro foram encontrados cerca de 43% de isolados positivos, enquanto que para o segundo apenas cerca de 6% (Tabelas 1 e 2).

Já para os micro-organismos isolados das iscas preparadas com substratos orgânicos, serragem e óleo diesel, dos 20 micro-organismos isolados, somente 2 apresentam o resultado positivo para a degradação de diesel no teste com TTC, representando uma porcentagem de 2% (Tabela 3).



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

Hidrocarbonetos de petróleo são moléculas resultantes da transformação de matéria orgânica ao longo de milhões de anos, portanto existem distribuídos no ambiente micro-organismos capazes de degradar estes compostos, porém eles podem estar em baixa quantidade e em desvantagem competitiva com outros micro-organismos (RICHARD e VOGEL, 1999). O que ocorre em ambientes contaminados com petróleo ou derivados recentemente é a seleção da microbiota com capacidade degradadora. A microbiota sofre uma adaptação, ou seja, as trocas genéticas e a evolução ocorrem e levam ao surgimento de novas populações que são resistentes e que podem degradar os xenobióticos (CRAWFORD, 2006). Por isso, nos solos contaminados, encontramos a maior proporção de isolados positivos para a degradação de diesel. Por outro lado, as iscas fabricadas com a intenção de captar micro-organismos degradadores existentes no ambiente, não foram tão eficientes neste objetivo, provavelmente por terem sido expostas por pouco tempo no ambiente, ou seja, 30 dias não foi um tempo suficiente para que ocorresse esta seleção natural naquele micro-ambiente da isca contendo óleo diesel.

Figura 1. Resultado positivo do teste de degradação de diesel com TTC: a fase aquosa se torna turva e de cor rosa (A), além de no fundo se depositar um precipitado colorido (B). HME4.6 – isolado do solo HM pelo método de enriquecimento; C- – controle negativo, sem inóculo de micro-organismo.

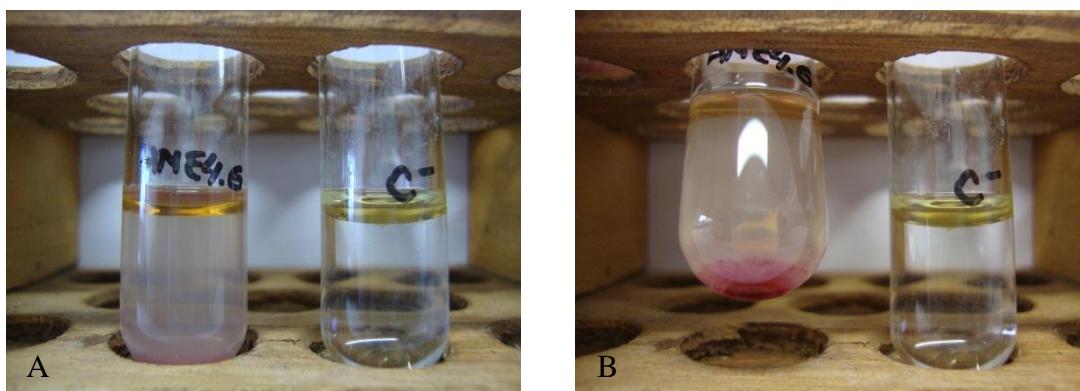


Tabela 1. Resultados de isolamentos diretos de solos contaminados com óleo diesel

Solo	Origem do solo	Contagem (UFC/mL)	Nº de bactérias isoladas	Nº de bactérias Diesel+TTC positivas
BP	Biopilha de solo contaminado com diesel em tratamento por bioestimulação	1,02E+08	9	0
HM	Solo onde frequentemente ocorrem pequenos vazamentos de óleo	8,30E+05	4	0
LE	Lodo de Estação de tratamento de efluente proveniente de lavagem de veículos	3,40E+08	5	1



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

Tabela 2. Resultados de isolamentos de solos contaminados com óleo diesel após período de enriquecimento

Solo	Origem do solo	Contagem (UFC/mL)	Nº de bactérias isoladas	Nº de bactérias Diesel+TTC positivas
BP	Biopilha solo contaminado com Diesel em tratamento por bioestimulação	2,00E+06	0*	--
HM	Solo onde frequentemente ocorrem pequenos vazamentos de óleo	5,80E+08	4	2
LE	Lodo de Estação de tratamento de efluente proveniente de lavagem de veículos	6,60E+07	0*	--
PK	Solo de posto de combustível com contaminação de diesel	8,00E+05	3	1

* Somente apresentaram colônias de leveduras

Tabela 3. Resultados de isolamentos a partir das iscas preparadas com óleo diesel

Isca	Local	Contagem (UFC/mL)	Nº de bactérias isoladas	Nº de bactérias Diesel+TTC positivas
2	pilha de 1 ano de compostagem de resíduos de indústria vinícola	1,40E+08	5	0
3	pilha de 3 anos de compostagem de resíduos de indústria vinícola	2,60E+07	4	2
5	próximo a vegetação arborícola em floresta ombrófila mista no município de Garibaldi – RS	2,40E+06	4	0
7	próximo a vegetação arbustiva em floresta ombrófila mista no município de Garibaldi – RS	1,96E+08	3	0
9	próximo a borda entre estrada e floresta ombrófila mista no município de Garibaldi – RS	7,20E+07	4	0

4 Conclusões e perspectivas

Foram isoladas neste trabalho seis bactérias que são potenciais degradadoras de óleo diesel, sendo a maioria proveniente do método de enriquecimento. Estes isolados poderão ser utilizados na remediação de solos e efluentes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, a fim de degradar as cadeias carbônicas pertencentes à faixa do óleo diesel (C-14 a C-20) seja em biopilhas ou em biorreatores de fase líquida ou semi-sólida. As próximas etapas desta pesquisa incluem ensaios experimentais de degradação de diesel diretamente em solos contaminados, em diferentes condições de adição de nutrientes e aeração.

5 Apoio Financeiro

Este trabalho foi realizado por bolsistas DTI e ITI de projeto aprovado em edital RHAE do CNPQ. Foi desenvolvido no Laboratório Beigroup, em parceria da empresa Purus Soluções Ambientais com as empresas Beifiur e Beifort. Possui também o financiamento de projeto aprovado no edital INOVAPE RS, do SEBRAE.



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

Referências

- ALVAREZ, P.J.J.; ILLMAN, W.A. **Bioremediation and natural attenuation:** process fundamentals and mathematical models. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006. 609p.
- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. “Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil”. **Environment International** v. 26, 2001, pg. 413-416.
- BASTOS, A. A. **Padronização do teste de Tetrazólio de sementes de *Parkia velutina* Benoit.** Monografia de Engenharia Florestal, Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2007, 39p.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. “Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation”. **Bioresource Technology** v. 96, 2005, pg. 1049 - 1055.
- BOOPATHY, R. “Factors limiting bioremediation technologies”. **Bioresource Technology** v. 74, 2000, pg. 63-67.
- CANTAGALLO, C.; MILANELLI, J.C.C. & DIAS-BRITO, D. “Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão”. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences** v. 2, n. 1, 2007, pg. 1-12.
- CRAWFORD, R.L. Bioremediation. In: **Prokaryotes** v. 1. Edited by Dworkin M. New York: Springer-Verlag Inc. pg. 850–863, 2006.
- DUTRA FILHO, V.T. **Informações sobre passivos.** Mensagem recebida por <anderson@purus.com.br> em 10 de outubro de 2011.
- GOVLEV, E.L. “Metabolism in *Nocardia* and *actinomycetes*”. **Actinomycetes** v. 13, 1978, pg. 59-101.
- IBAMA, 2012. **Acidentes ambientais janeiro de 2012.** Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/acidentes-ambientais-janeiro-2012>> Acessado em: 3 de fevereiro de 2012.
- JACQUES, R.J.S.; SANTOS, E.C., BENTO, F.M.; PERALBA, M.C.R.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S.; CAMARGO, F.A.O. “Anthracene biodegradation by *Pseudomonas sp.* isolated from a petrochemical sludge landfarming site”. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 56, 2005, pg. 143–150.
- KUNZ, V.T. **Glechon spatulata Benth.: Estudo fitoquímico e biológico.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria – RS, 2007, 88 p.
- LEAHY, J.G. & COLWELL, R.R. “Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbiological Reviews” v. 54, n. 3, 1990, pg. 305-315.



3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

PEDROZO, M.F.M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo** (Cadernos de Referência Ambiental, vol.12). Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002, 246p.

PERES, T.B.; ANDRÉA, M.M.; LUCHINI, L.C. “*Agrotóxicos usados na cultura do algodão: efeito na atividade das enzimas desidrogenase e arisulfatase do solo*”. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo** v. 71, n. 3, jul./set., 2004, pg. 363-369.

RICHARD, J.Y.; T.M. VOGEL. *Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel*. **International Biodeterioration & Biodegradation** 44: 93-100. 1999.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of petroleum contaminated soils**: biological, physical and chemical processes. Lewis Publishers, 1998, 542 p.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. “*Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation*”. **Environmental Pollution** v. 136, 2005, pg. 187-195.

ZHANG, H.; KALLIMANIS, A.; KOUKKOU, A.I.; DRAINAS,C. “*Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils*”. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 65, 2004, pg. 124–131.